

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: <div style="text-align: center;">25 May 2000 (25.05.00)</div>	
International application No.: <div style="text-align: center;">PCT/JP99/06283</div>	Applicant's or agent's file reference: <div style="text-align: center;">2568WO0P</div>
International filing date: <div style="text-align: center;">11 November 1999 (11.11.99)</div>	Priority date: <div style="text-align: center;">13 November 1998 (13.11.98)</div>
Applicant: <div style="text-align: center;">WATANABE, Takuya et al</div>	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  

06 January 2000 (06.01.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  

\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  <div style="text-align: center;">J. Zahra</div> Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

担当者	G・M	Pat・M	部長
-----	-----	-------	----

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP99/06283

**PCT**

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 01 December 1999 (01.12.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 2568WOOP	<b>International application No.</b> PCT/JP99/06283

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)  
WATANABE, Takuya et al (for US)

International filing date : 11 November 1999 (11.11.99)

Priority date(s) claimed : 13 November 1998 (13.11.98)

08 March 1999 (08.03.99)

14 April 1999 (14.04.99)

14 June 1999 (14.06.99)

04 August 1999 (04.08.99)

14 September 1999 (14.09.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 29 November 1999 (29.11.99)

List of designated Offices :

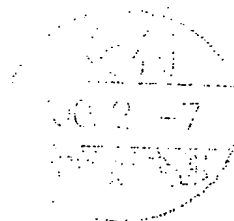
AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,  
IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,  
TR,TT,TZ,UA,US,UZ,VN,YU,ZA



<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Shinji IGARASHI
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Continuation of Form PCT/IB/301

## NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 01 December 1999 (01.12.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2568WOOP	International application No. PCT/JP99/06283

**ATTENTION**

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

### INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

### REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 2568WOOP			
International application No. PCT/JP99/06283	International filing date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)	Priority date (day/month/year) 13 November 1998 (13.11.98)	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, MA, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BY, CR, CU, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, KG, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MX, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 27 January 2000 (27.01.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 2568WOOP	
International application No. PCT/JP99/06283	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	International filing date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)  Priority date (day/month/year) 13 November 1998 (13.11.98)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
13 Nov 1998 (13.11.98)	10/323759	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)
08 Marc 1999 (08.03.99)	11/60030	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)
14 Apri 1999 (14.04.99)	11/106812	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)
14 June 1999 (14.06.99)	11/166672	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)
04 Augu 1999 (04.08.99)	11/221640	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)
14 Sept 1999 (14.09.99)	11/259818	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Taïeb Akremi  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)



# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

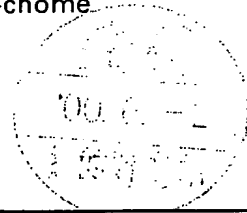
PCT

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON



Date of mailing (day/month/year)  
25 May 2000 (25.05.00)

Applicant's or agent's file reference  
2568WO0P

### IMPORTANT NOTICE

International application No.  
PCT/JP99/06283

International filing date (day/month/year)  
11 November 1999 (11.11.99)

Priority date (day/month/year)  
13 November 1998 (13.11.98)

Applicant  
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,JP,KR,MA,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KG,  
KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,  
UZ,VN,YU,ZA  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
25 May 2000 (25.05.00) under No. WO 00/29441

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PATENT COOPERATION TREATY**  
**PCT**  
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**  
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>2568WO0P</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/JP99/06283</b>	International filing date (day/month/year) <b>11/11/1999</b>	Priority date (day/month/year) <b>13/11/1998</b>	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>Int.C1<sup>7</sup> C07K14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K16/28, A61K39/395, G01N33/50, C07K2/00, A61K38/00</b>			
Applicant <b>TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD</b>			

1.	This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of    sheets.	

3.	This report contains indications relating to the following items:
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  <b>06/01/2000</b>	Date of completion of this report  <b>28/11/2000</b>
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer <b>OGURA Michiaki</b>  Telephon No. 03 3581 1101                      3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP99/06283

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):

☒ International Filing Document as originally filed

**Description, pages:**

- ☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Claims, No:**

- ☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Drawings No:**

- ☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

**Sequence Listing**

- ☐ as originally filed  
☐ as received on with letter of

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).  
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).  
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.  
☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:  
☐ the claims, Nos.:  
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP99/06283

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-44
	No:	Claims	
Inventive Step (IS)	Yes:	Claims	1-44
	No:	Claims	
Industeial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-44
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations**  
See attached

THIS PAGE BLANK (USPTO)



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

## V.2 Citations and explanations

5 In "JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), September 16, 1997 (16.09.97)" and "WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD), July 10, 1997 (10.07.97)" listed in the international search report, a method for obtaining a novel G protein-coupled receptor protein or a novel ligand polypeptide is described.

10 The method for obtaining a novel G protein-coupled receptor protein or a novel ligand polypeptide described in the present specification is similar to, in particular, the method described in the latter literature.

15 However, the inventions directed to the novel G protein-coupled receptor protein, novel ligand polypeptide, etc., in other words, the inventions recited in claims 1 through 44 are neither similar to any of those described in the literature *supra*, nor obvious to one skilled in the art.

20 Moreover, the inventions described in claims 1 to 44 are neither described in nor obvious over "Daniela Marazziti et al.; 'Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis', Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, p. 315-324".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Claims 1 to 27:

Regarding the "polypeptide containing ..... the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 ....." recited in claim 1, it is described in the specification that the polypeptide is "human type" "novel  
5 physiologically active polypeptide", which becomes a ligand to a novel receptor protein. However, the specification fails to give any concrete explanation, with what physiological activities the polypeptide is actually associated as a ligand. Also, in light of the technical common knowledge at the time when this application was filed, the physiological  
10 activities are unclear.

Thus, since it is unclear what functions the polypeptide actually exhibits for the "polypeptide containing ..... the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 ....." claimed in claim 1, it should be said that how to use the polypeptide specifically is unclear as well.

15 Now an invention that is unclear to one skilled in the art in terms of how to use the invention even in light of the description in its specification and the technical common knowledge as of filing of this application is not recognized to be sufficiently supported in the specification.

20 In short, it is not recognized that the invention of claim 1 is sufficiently supported by the specification and drawings.

On the same ground, it is recognized that the inventions of claims 2 through 27 are not fully supported by the specification and drawings.

25 Claims 28 through 44:

Regarding the "protein containing ..... the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:37 ....." recited in claim 28, it is described in the specification that the protein is "rat cerebellum-derived" "novel  
30 G protein-coupled receptor protein" and it reacts with a polypeptide comprising the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:40. However, the specification fails to give any concrete explanation, with what physiological activities the receptor protein is actually associated. Also, in light of the technical common knowledge at the time when this application was filed, the physiological activities are  
35 unclear.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Thus, since it is unclear what functions the protein in the "protein containing ..... the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:37 ....." recited in claim 28, it should be said that how to use the protein specifically is unclear as well.

5        Now, an invention that is unclear to one skilled in the art in terms of how to use the invention even in light of the description in its specification and the technical common knowledge as of filing of its application is not recognized to be sufficiently supported in the specification.

10       In short, it is not recognized that the invention of claim 28 is sufficiently supported by the specification and drawings.

      On the same ground, it is recognized that the inventions of claims 29 through 44 are not fully supported by the specification and drawings.

15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(ii) Assuming that user X can open the door, the Door Concept object 10a constructs the message '<door id>, <open>' and sends it (2) to the DM 22.

The DM delivers the incoming message (2) to its version of the door entity, the Sliding Door Dynamic object 12a, using the unique identifier that heads the message. The Sliding Door Dynamic object 12a constructs a message for the Visual Representative Objects 14a of the form '<door id>, <open>, <to position ...., over time ...>'.

(iii) This message (3) is sent to all clients 24 having an instance of the relevant Visual Representative Object 14a. The Dynamic Representative Object 12a will, during a predefined time period, open the door whilst checking for collisions with Dynamic Representative Objects. Each client 24 receiving message (3) from the DM 22 will route it to its instance of the entity, the Sliding Door Visual object 14a.

The object 14a utilises the position and time data indicated in the message to animate the door opening with the appropriate visual effects.

Should the Dynamic Representative Object 12a detect a variation from the predicted situation, perhaps caused by collision or the destruction of the door, it will generate a new message for the clients 24 to update their Visual Representative Objects 14a of the form '<door id>, <stop opening>, <at position ....>'.

It is to be noted that to provide an efficient implementation, the message format should be highly optimised rather than the ASCII strings indicated above. By way of example, if each of the concept/dynamic/visual representative objects has a defined, numbered set of requests, the message header becomes a pair of numbers. The first number, the entity id, allows incoming messages to be routed to the correct representative objective. The second number, the request, allows the relevant method on the representative object to be called. This can then unpack any additional data supplied in the message and implement the required request on a single server is unlikely to achieve the desired level of scalability. The vast majority of network traffic generated in a VE is related to the dynamics of the environment. Hence a single server could quickly form a communications

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



connections 23, whilst potentially low bandwidth, should offer consistent latency and bandwidth. Running IP (Internet Protocol) over a dial-in system over the PSTN (Public Switched Telecommunications Network) using PPP (Point-to-Point Protocol) should, for example, be suitable. The architecture is also highly suited to an asynchronous client network 23 such as those provided by ADSL (Asymmetric Digital Subscriber Line) technology where the downstream capacity is higher than the upstream capacity.

Figure 3 shows an example of messaging interaction between respective clients and a Rule Manager 20 and a Dynamics Manager 22.

It will be assumed that the implemented embodiment uses a unique identifier to represent each entity within the system and that in particular a given door entity type may be represented as 'Door Concept, Sliding Door Dynamic, Sliding Door Visual'. The implemented embodiment further provides for sequenced, reliable message transfer between representatives objects of the same entity with an example message format of the form '<destination entity>, <request>, <... optional data ...>'. A particular set of actions that the user can perform on each Visual Representative Object 14 will be defined.

In the example of Figure 3, the Rule Manager 20 will have an instance of a Door Concept object 10a, the Dynamics Manager 22 will have an instance of a Sliding Door Dynamic object 12a and the clients 24 will have instances of the respective Sliding Door Visual object 14a. Each will be assigned the same identity door id.

Referring to the illustrative steps in Figure 3.

(i) Through a Graphical User Interface (GUI), a user of a first client 24 selects the action 'open' from a list of actions permitted in respect of the Sliding Door Visual object 14a shown at the client.

The Sliding Door Visual object 14a constructs a message '<door id>, <client action>, <open, from user X>' which is sent to the RM 20. The RM delivers the incoming message (1) to its Dynamics Manager 22 that forwards the message. The Door Concept object 10a processes the request and, using internal game logic, decides if user X can, in fact, open the door.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2568WO0P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06283	International filing date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)	Priority date (day/month/year) 13 November 1998 (13.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 January 2000 (06.01.00)	Date of completion of this report 28 November 2000 (28.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/JP99/06283

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 99/06283

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-44	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-44	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-44	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September 1997 (16.09.97) and WO, 97/24436, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 July 1997 (10.07.97) cited in the international search report disclose processes for obtaining novel G-protein-coupled receptor proteins and novel ligand polypeptides.

Moreover, the processes for obtaining novel G-protein-coupled receptor proteins and novel ligand polypeptides described in the description of the present application resemble especially the methods disclosed in the second document cited above.

However, the novel G-protein-coupled receptor proteins and novel ligand polypeptides, etc., actually obtained in the invention of the present application, which constitute the invention described in Claims 1-44, do not resemble the inventions disclosed in the above documents, and would not be obvious to a person skilled in the art from the disclosures therein.

Moreover the invention described in Claims 1-44 is not disclosed in Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, pp. 315-324, cited in the international search

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



report; nor would it be obvious to a person skilled in the art from disclosures therein.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

## Claims 1-27

The description of the invention describes the "polypeptide ... containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 ..." described in Claim 1 as a "human" "physiologically active polypeptide", and indicates that it is a novel receptor protein ligand. However, the description does not indicate any specific physiological activity actually linked with said polypeptide, and said physiological activity would not be clear from common general knowledge of the art at the time of filing the present application.

The actual function of the "polypeptide ... containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 ..." described in Claim 1 is thus unclear, and consequently its specific application is unclear.

An invention the applicability whereof would be unclear to a skilled man from reference to the description of the invention together with common general knowledge of the art at the time of filing cannot be considered to be fully supported by the description.

Therefore, the invention as described in Claim 1 is not fully supported by the description and drawings.

For the same reason, the invention as described in Claims 2-27 is also not fully supported by the description and drawings.

## Claims 28-44

The description states that the "protein ... containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 37 ..." described in Claim 28 is "a novel G-protein-coupled receptor protein" "from the region around the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

brainstem of the rat", and indicates that it reacts with a polypeptide comprising an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 39 or SEQ ID NO: 40. However, the description does not indicate any specific physiological activity actually linked with said receptor, and said physiological activity would not be clear from common general knowledge of the art at the time filing.

The actual function of the "protein ... containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 37 ..." described in Claim 28 is thus unclear, and consequently its specific application is unclear.

An invention the applicability whereof would be unclear to a skilled man from reference to the description of the invention together with common general knowledge of the art at the time of filing cannot be considered to be fully supported by the description.

Therefore, the invention as described in Claim 28 is not fully supported by the description and drawings.

For the same reason, the invention as described in Claims 29-44 is also not fully supported by the description and drawings.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT


## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 2568WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06283	国際出願日 (日.月.年) 11. 11. 99	優先日 (日.月.年) 13. 11. 98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>1</sup> C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/28 A61K39/395, G01N33/50, C07K2/00, A61K38/00		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で          ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06. 01. 00	国際予備審査報告を作成した日 28. 11. 00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 印 	4 B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

THIS PAGE RANK (USPTO)



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT 35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-44 有  
請求の範囲 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-44 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-44 有  
請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明 (PCT 規則70.7)

国際調査報告に列記された「JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16.9月.1997 (16.09.97)」及び「WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD) 10.7月.1997 (10.07.97)」には、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質や新規リガンドポリペプチドの取得方法が記載されている。

そして、本願明細書に記載された新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質や新規リガンドポリペプチドの取得方法は、特に後者の文献に記載された取得方法と類似している。

しかし、本願発明において実際に取得された新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、新規リガンドポリペプチド等、換言すれば、請求の範囲1-44に記載された発明については、上記文献に記載された発明と類似しておらず、かつ、それらの記載から当業者にとって自明なものでもない。

さらに、請求の範囲1-44に記載された発明は、国際調査報告に列記された「Daniela Marazziti et al.; "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, p.315-324」にも記載されておらず、その記載から当業者にとって自明なものでもない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

・請求の範囲 1－27 について

請求の範囲 1 に記載の「配列番号：1 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・ポリペプチド」について、明細書には、「ヒト型」の「新規生理活性ポリペプチド」であり、新規受容体蛋白質のリガンドとなる旨記載されている。しかし、該ポリペプチドがリガンドとして実際にどのような生理活性と関連したものであるのかは具体的に明細書中に記載されておらず、また、本願出願時の技術常識を考慮しても、該生理活性については不明である。

してみると、請求の範囲 1 に記載の「配列番号：1 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・ポリペプチド」について、該ポリペプチドが実際にいかなる機能を有するものが不明であるといえるから、具体的にどの様に使用できるのかも不明であるといえる。

ここで、明細書の記載及び本願出願時の技術常識を参酌しても、当業者が具体的にどの様に使用したらよいのかが不明な発明は、明細書により十分裏付けられた発明とは認められない。

つまり、請求の範囲 1 に記載された発明について、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲 2－27 に記載された発明についても、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

・請求の範囲 28－44 について

請求の範囲 28 に記載の「配列番号：37 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・蛋白質」について、明細書には、「ラット脳幹周辺部由来」の「新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質」であり、配列番号：39 や配列番号：40 に示されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと反応する旨記載されている。しかし、該レセプター蛋白質が実際にどのような生理活性と関連したものであるのかは具体的に明細書中に記載されておらず、また、本願出願時の技術常識を考慮しても、該生理活性については不明である。

してみると、請求の範囲 28 に記載の「配列番号：37 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・蛋白質」について、該蛋白質が実際にいかなる機能を有するものが不明であるといえるから、具体的にどの様に使用できるのかも不明であるといえる。

ここで、明細書の記載及び本願出願時の技術常識を参酌しても、当業者が具体的にどの様に使用したらよいのかが不明な発明は、明細書により十分裏付けられた発明とは認められない。

つまり、請求の範囲 28 に記載された発明について、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲 29－44 に記載された発明についても、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

EP

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2568WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06283	国際出願日 (日.月.年) 11. 11. 99	優先日 (日.月.年) 13. 11. 98
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>1</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16.9月.1997 (16.09.97) ファミリーなし	1-44
X	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD) 10.7月.1997 (10.07.97) & AU, 9712084, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A2	1-44
X	Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol.53, No.3, p.315-324	1-44

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.02.00

国際調査報告の発送日

29.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358


電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# 特許協力条約に基づく国際出願

## 願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	受理官庁記入欄
国際出願日	
(受付印)	

出願人又は代理人の書類記号  
(希望する場合、最大12字)

2568WO0P

### 第 I 欄 発明の名称

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、そのDNAおよびそのリガンド

### 第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社  
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,  
OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

### 第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

渡辺 卓也 WATANABE Takuya  
〒532-0033 日本国大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B 904号  
14-9-B904, Niitaka 6-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA  
532-0033 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

### 第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi  
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社大阪工場内  
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,  
OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  
 菊地 久仁子 KIKUCHI Kuniko  
 〒302-0024 茨城県取手市新町五丁目8-18 サンハイツ101号  
 Sanhaitsu 101, 8-18, Shinmachi 5-chome, Toride-shi, IBARAKI  
 302-0024 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  
 寺尾 寧子 TERA0 Yasuko  
 〒305-0034 日本国茨城県つくば市大字小野崎985番地ROYAL  
 ZOA中山307号  
 ROYAL ZOA Nakayama307, Oaza Onozaki 985, Tsukuba-shi, IBARAKI  
 305-0034 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  
 新谷 靖 SHINTANI Yasushi  
 〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春  
 日ハイツ703号  
 Takeda Kasuga Haitzu 703, 7-9, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi,  
 IBARAKI 305-0821 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  
 日沼 州司 HINUMA Shuji  
 〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春  
 日ハイツ1402号  
 Takeda Kasuga Haitzu 1402, 7-9, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi,  
 IBARAKI 305-0821 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

福住 昌司 FUKUSUMI Shoji  
〒305-0044 日本国茨城県つくば市並木3丁目17番地6 ロイヤル  
シティ並木302号  
Royal City Namiki 302, 17-6, Namiki 3-chome, Tsukuba-shi,  
IBARAKI 305-0044 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

藤井 亮 FUJII Ryo  
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日  
ハイツ303号  
Takeda Kasuga Haitzu 303, 7-9, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi,  
IBARAKI 305-0821 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

細谷 昌樹 HOSOYA Masaki  
〒300-0007 日本国茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83  
711-83, Itaya 1-chome, Tsuchiura-shi, IBARAKI.  
300-0007 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

北田 千恵子 KITADA Chieko  
〒590-0073 日本国大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号  
2-8, Minamikoyochō 1-cho, Sakai-shi, OSAKA  
590-0073 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと; 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

## 広域特許

- ☒ AP **ARIPO特許** : GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレブプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EA **ユーラシア特許** : AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EP **ヨーロッパ特許** : AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ OA **OAPI特許** : BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサオ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                       | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania                                       | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia                                       | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria                                      | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia                                   | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados                                      | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria                                      | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil   | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus                                       | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada  | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China  | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba   | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic                                 | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany   | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark                                       | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia                                       | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain  | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland                                      | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom                                   | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada  | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia  | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana   | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia   | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia                                       | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary                                       | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia                                    | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel  | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland                                      |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan                                     |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea           |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea                                |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan                                   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia                                 |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka                                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania                                     |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg                                  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia  |  |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

- ☒ CR コスタリカ Costa Rica
- ☒ DM ドミニカ Dominica
- ☒ TZ タンザニア Tanzania
- ☒ MA モロッコ Morocco
- ☐
- ☐

確認の指定の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9(b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 (指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**追記欄** この追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄.....の続き」(欄番号を表示する) と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。; 特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「読葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅵ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,  
OSAKA 532-0024 JAPAN

「第Ⅵ欄の続き」

(4)

国名	日本国 Japan
先の出願日	14.06.99
先の出願番号	平成11年特許願第166672号

(5)

国名	日本国 Japan
先の出願日	04.08.99
先の出願番号	平成11年特許願第221640号

(6)

国名	日本国 Japan
先の出願日	14.09.99
先の出願番号	平成11年特許願第259818号

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

第Ⅵ欄 優先権主張



他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先 の 出 願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 13. 11. 98	平成10年特許願 第323759号	日本国 Japan		
(2) 08. 03. 99	平成11年特許願 第060030号	日本国 Japan		
(3) 14. 04. 99	平成11年特許願 第106812号	日本国 Japan		

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限り)のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本国特許庁の長官)に対して請求している。

(1), (2), (3), (4), (5), (6)

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第Ⅶ欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会  
(先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

第Ⅷ欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 . . . . . 6 枚  
明細書(配列表を除く). . . . . 134 枚  
請求の範囲 . . . . . 5 枚  
要約書 . . . . . 1 枚  
図面 . . . . . 9 枚  
明細書の配列表 . . . . . 32 枚  
合計 . . . . . 187 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- |  |  |
|--|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙       | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第Ⅵ欄の( ) の番号を記載する):    |
| <input type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面     | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文(翻訳に使用した言語名を記載する):     |
| <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面        | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面          |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 8. <input type="checkbox"/> ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表(フレキシブルディスク) |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> 包括委任状の写し      | 9. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する):             |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)の説明書             |  |

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名:

日本語

IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		2. 図面	
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)		<input type="checkbox"/> 受理された	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月:再版1999年7月)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

担当者	G・M	Pat・M	部長

13

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社 知的財産部

00.6.18

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]



発送日  
(日.月.年)

18.04.00

出願人又は代理人  
の書類記号

2568WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P99/06283

国際出願日

(日.月.年) 11.11.99

優先日

(日.月.年) 13.11.98

国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02,  
C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 37/00

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
  - ☒ 見解の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☒ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に应答することが求められる。
 

いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

应答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 13.03.01 である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9358
--	--	----	------

THIS PAGE BLANK (USPTO)



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-44	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-44	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-44	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

国際調査報告に列記された「JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16.9月.1997 (16.09.97)」及び「WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD) 10.7月.1997 (10.07.97)」には、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質や新規リガンドポリペプチドの取得方法が記載されている。

そして、本願明細書に記載された新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質や新規リガンドポリペプチドの取得方法は、特に後者の文献に記載された取得方法と類似している。

しかし、本願発明において実際に取得された新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、新規リガンドポリペプチド等、換言すれば、請求の範囲1-44に記載された発明については、上記文献に記載された発明と類似しておらず、かつ、それらの記載から当業者にとって自明なものでもない。

さらに、請求の範囲1-44に記載された発明は、国際調査報告に列記された「Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, p. 315-324」にも記載されておらず、その記載から当業者にとって自明なものでもない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

・請求の範囲 1－27 について

請求の範囲 1 に記載の「配列番号：1 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・ポリペプチド」について、明細書には、「ヒト型」の「新規生理活性ポリペプチド」であり、新規受容体蛋白質のリガンドとなる旨記載されている。しかし、該ポリペプチドがリガンドとして実際にどのような生理活性と関連したものであるのかは具体的に明細書中に記載されておらず、また、本願出願時の技術常識を考慮しても、該生理活性については不明である。

してみると、請求の範囲 1 に記載の「配列番号：1 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・ポリペプチド」について、該ポリペプチドが実際にいかなる機能を有するものが不明であるといえるから、具体的にどの様に使用できるのかも不明であるといえる。

ここで、明細書の記載及び本願出願時の技術常識を参酌しても、当業者が具体的にどの様に使用したらよいのかが不明な発明は、明細書により十分裏付けられた発明とは認められない。

つまり、請求の範囲 1 に記載された発明について、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲 2－27 に記載された発明についても、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

・請求の範囲 28－44 について

請求の範囲 28 に記載の「配列番号：37 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・蛋白質」について、明細書には、「ラット脳幹周辺部由来」の「新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質」であり、配列番号：39 や配列番号：40 に示されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと反応する旨記載されている。しかし、該レセプター蛋白質が実際にどのような生理活性と関連したものであるのかは具体的に明細書中に記載されておらず、また、本願出願時の技術常識を考慮しても、該生理活性については不明である。

してみると、請求の範囲 28 に記載の「配列番号：37 で表されるアミノ酸配列・・・を含有する・・・蛋白質」について、該蛋白質が実際にいかなる機能を有するものが不明であるといえるから、具体的にどの様に使用できるのかも不明であるといえる。

ここで、明細書の記載及び本願出願時の技術常識を参酌しても、当業者が具体的にどの様に使用したらよいのかが不明な発明は、明細書により十分裏付けられた発明とは認められない。

つまり、請求の範囲 28 に記載された発明について、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲 29－44 に記載された発明についても、明細書及び図面による十分な裏付がないものと認められる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# 特許協力条約



発信人 日本国特許庁 (受理官庁)

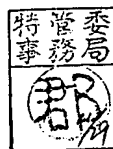
出願人代理人

高橋 秀一

担当者	G・M		Pat・M	部長
あて名				

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社知的財産部



P C T

233回(2001.1/14~15)  
にて審議。

## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

(法施行規則第22条、第23条)  
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/06283

RO105

発送日 (日. 月. 年)

24. 11. 99

出願人又は代理人  
の書類記号

2568WOOP

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06283

国際出願日 (日. 月. 年)

11. 11. 99

優先日 (日. 月. 年)

13. 11. 98

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、24 日 11 月 99 年 に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード (日本の場合JP)、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名 (名称) に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知 (様式PCT/IB/301) する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁 (RO/JP)

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105 (1998年7月)

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO),



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06283

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97) (Family: none)	1-44
X	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD), 10 July, 1997 (10.07.97) & AU, 9712084, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A2	1-44
X	Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol.53, No.3, p.315-324	1-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 February, 2000 (17.02.00)

Date of mailing of the international search report  
29 February, 2000 (29.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16.9月.1997 (16.09.97) ファミリーなし	1-44
X	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD) 10.7月.1997 (10.07.97) & AU, 9712084, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A2	1-44
X	Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, p. 315-324	1-44

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.02.00

国際調査報告の発送日

29.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明 印

4B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<b>(51) 国際特許分類7</b> <b>C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02,</b> <b>C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/50,</b> <b>C07K 2/00, A61K 38/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/29441</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年5月25日 (25.05.00)																				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 45%; vertical-align: top;"> <b>(21) 国際出願番号</b>            PCT/JP99/06283   <b>(22) 国際出願日</b>            1999年11月11日 (11.11.99)   <b>(30) 優先権データ</b>  <table border="0"> <tr> <td>特願平10/323759</td> <td>1998年11月13日 (13.11.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/60030</td> <td>1999年3月8日 (08.03.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/106812</td> <td>1999年4月14日 (14.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/166672</td> <td>1999年6月14日 (14.06.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/221640</td> <td>1999年8月4日 (04.08.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/259818</td> <td>1999年9月14日 (14.09.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table>   <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b>            武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]            〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)  <b>(72) 発明者; および</b>  <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</b>            渡辺卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP]            〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka, (JP)            菊地久仁子 (KIKUCHI, Kuniko) [JP/JP]            〒302-0024 茨城県取手市新町五丁目8-18 サンハイツ101号 Ibaraki, (JP)            寺尾翠子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP]            〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地            ROYAL ZOA 中山307号 Ibaraki, (JP)            新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]            〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki, (JP)            沼州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]            〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9            武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP)         </td> <td style="width: 55%; vertical-align: top;">           福住昌司 (FUKUSUMI, Shoji) [JP/JP]            〒305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17番地6            ロイヤルシティ並木302号 Ibaraki, (JP)            藤井 亮 (FUJII, Ryo) [JP/JP]            〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ303号 Ibaraki, (JP)            細谷昌樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP]            〒300-0007 茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83 Ibaraki, (JP)            北田千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]            〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka, (JP)  <b>(74) 代理人</b>            弁理士 高橋秀一、外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.)            〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号            武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)   <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)             添付公開書類            国際調査報告書         </td> </tr> </table>			<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06283  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月11日 (11.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/323759</td> <td>1998年11月13日 (13.11.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/60030</td> <td>1999年3月8日 (08.03.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/106812</td> <td>1999年4月14日 (14.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/166672</td> <td>1999年6月14日 (14.06.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/221640</td> <td>1999年8月4日 (04.08.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/259818</td> <td>1999年9月14日 (14.09.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</b> 渡辺卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP] 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka, (JP) 菊地久仁子 (KIKUCHI, Kuniko) [JP/JP] 〒302-0024 茨城県取手市新町五丁目8-18 サンハイツ101号 Ibaraki, (JP) 寺尾翠子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP] 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地 ROYAL ZOA 中山307号 Ibaraki, (JP) 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki, (JP) 沼州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP)	特願平10/323759	1998年11月13日 (13.11.98)	JP	特願平11/60030	1999年3月8日 (08.03.99)	JP	特願平11/106812	1999年4月14日 (14.04.99)	JP	特願平11/166672	1999年6月14日 (14.06.99)	JP	特願平11/221640	1999年8月4日 (04.08.99)	JP	特願平11/259818	1999年9月14日 (14.09.99)	JP	福住昌司 (FUKUSUMI, Shoji) [JP/JP] 〒305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17番地6 ロイヤルシティ並木302号 Ibaraki, (JP) 藤井 亮 (FUJII, Ryo) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ303号 Ibaraki, (JP) 細谷昌樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP] 〒300-0007 茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83 Ibaraki, (JP) 北田千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP] 〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 高橋秀一、外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06283  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月11日 (11.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/323759</td> <td>1998年11月13日 (13.11.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/60030</td> <td>1999年3月8日 (08.03.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/106812</td> <td>1999年4月14日 (14.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/166672</td> <td>1999年6月14日 (14.06.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/221640</td> <td>1999年8月4日 (04.08.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/259818</td> <td>1999年9月14日 (14.09.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</b> 渡辺卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP] 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka, (JP) 菊地久仁子 (KIKUCHI, Kuniko) [JP/JP] 〒302-0024 茨城県取手市新町五丁目8-18 サンハイツ101号 Ibaraki, (JP) 寺尾翠子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP] 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地 ROYAL ZOA 中山307号 Ibaraki, (JP) 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki, (JP) 沼州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP)	特願平10/323759	1998年11月13日 (13.11.98)	JP	特願平11/60030	1999年3月8日 (08.03.99)	JP	特願平11/106812	1999年4月14日 (14.04.99)	JP	特願平11/166672	1999年6月14日 (14.06.99)	JP	特願平11/221640	1999年8月4日 (04.08.99)	JP	特願平11/259818	1999年9月14日 (14.09.99)	JP	福住昌司 (FUKUSUMI, Shoji) [JP/JP] 〒305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17番地6 ロイヤルシティ並木302号 Ibaraki, (JP) 藤井 亮 (FUJII, Ryo) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ303号 Ibaraki, (JP) 細谷昌樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP] 〒300-0007 茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83 Ibaraki, (JP) 北田千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP] 〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 高橋秀一、外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書			
特願平10/323759	1998年11月13日 (13.11.98)	JP																				
特願平11/60030	1999年3月8日 (08.03.99)	JP																				
特願平11/106812	1999年4月14日 (14.04.99)	JP																				
特願平11/166672	1999年6月14日 (14.06.99)	JP																				
特願平11/221640	1999年8月4日 (04.08.99)	JP																				
特願平11/259818	1999年9月14日 (14.09.99)	JP																				
<b>(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN, ITS DNA AND LIGAND THEREOF</b>																						
<b>(54) 発明の名称</b> 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、そのDNAおよびそのリガンド																						
<b>(57) Abstract</b> A novel polypeptide, its peptide fragments or salts thereof; a process for producing this polypeptide; a receptor of the polypeptide; drugs containing the polypeptide, etc.; an antibody against the polypeptide; a method/kit for screening compounds promoting or inhibiting the activity of the polypeptide; the compounds obtained by the screening; and drugs, etc. containing these compounds. The above polypeptide or its peptide fragments are usable as, for example, remedies for nervous diseases and somatostatin excretion promoters. The above antibody is usable in, for example, quantitating the polypeptide in a liquid specimen. Further, the polypeptide is useful as a reagent for screening the compounds promoting or inhibiting the activity of the polypeptide.																						

本発明は、新規ポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドの受容体、該ポリペプチド等を含有してなる医薬、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物、該化合物を含有してなる医薬などに関する。

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドなどは、例えば、神経疾患治療剤、ソマトスタチン分泌促進剤などとして使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のポリペプチドの定量などに使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CN	中国	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

## 明 細 書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、そのDNAおよびそのリガンド

## 5 技術分野

本発明は新規ポリペプチド（本明細書においては、新規生理活性ポリペプチドと称する場合もある。）、その部分ペプチド、それらをコードするDNA、および該ポリペプチドをリガンドとして認識する受容体蛋白質、その部分ペプチド、それらをコードするDNAなどに関する。特に、R F amide様構造を有することを特徴とする新規ポリペプチドおよびその部分ペプチドなどに関する。

## 背景技術

ペプチドは代謝、成長、生殖、恒常性維持、精神活動、生体防御など生体の機能を調節するための分子として重要な役割を担っている。これらのペプチドは細胞膜上の特異的な受容体15に結合することによりその情報を細胞に伝える。これまでこのような生理活性ペプチドの多くは、その生理活性に基づいて組織抽出物等から単離されその構造が決定されてきた。また最近では受容体を利用して組織抽出物等から生理活性ペプチドを単離することもなされるようになってきた。

一方、最近のゲノムや cDNA の配列解析の急速な進展により、膨大な DNA 情報が入手可能20になった。これらの DNA の中にはこれまで未知であった生理活性ペプチドをコードするものが含まれているものと推定される。しかし生理活性ペプチドは非常に短いアミノ酸配列しか持たないものが多く、ゲノム DNA 配列や Expressed Sequence Tag (EST) から、既知の生理活性ペプチドと一部類似した配列あるいは共通のモチーフを有する未知の生理活性ペプチドを探そうとしても、類似した配列は生理活性ペプチドとは全く無関係な蛋白の遺伝子や非翻訳25領域の DNA 配列中にも頻繁に見出されるため、それらの中からどれが本当の生理活性ペプチドであるかを確定することは非常に困難であった。

生理活性ペプチドの1種である FMRFamide は二枚貝のビノスワスガレイの神経節より初めて単離、構造決定されたペプチドである (Price D. A. & Greenberg, M. J., Science, 197, 670-671, 1977)。その後、C末端に RFamide 構造を持つペプチドやそれに類似の構造を持つペプチドが無脊椎動物で多くの種に広く分布することが分かってきた。特にセンチュウにおいては多くの RFamide 構造を有するペプチドが存在していることが報告されており、しかもそれらの多くは一つの遺伝子上に複数個が連続して乗っていることが知られている (Nelson, L. S., et al., Molecular Brain Research 58, 103-111, 1998)。

一方、脊椎動物において RFamide 構造を有する FMRFamide 様のペプチドとしては、鶏の脳から LPLRFamide が単離同定されているが、その遺伝子構造は未だに明らかにされていない (Dockray, G. J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983)。また魚類では最近 RFamide 構造を有するペプチドとして C-RFa が報告されている。哺乳動物における RFamide 構造を有するペプチドとしてはウシから精製単離された2種のペプチド (Yang, H.-Y. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7757-7761, 1985) とそれに対応すると考えられるヒト cDNA から同定された neuropeptide SF (NSF) および neuropeptide AF (NAF) がある。また最近我々は RFamide 構造を有するヒト、ウシ、ラット Prolactin-releasing peptide (PrRP) (Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998) を同定している。

FMRFamide ペプチドの生理活性に関してはさまざまな報告がある。例えば FMRFamide の作用としては、心臓拍動の促進や抑制、各種歯舌筋や内臓筋、各種牽引筋の収縮や弛緩、さらには神経細胞の過分極や脱分極等が知られている。また PrRP に関してはプロラクチン放出促進活性が、また LPLRFamide に関しても神経細胞の刺激効果や、血圧上昇作用等が報告されている。

以上のように RFamide 構造を持つペプチドに関しては多くの重要な生理作用が報告されている。しかし NSF、NAF、PrRP 以外に哺乳動物で RFamide あるいはそれに類似する構造を有



するペプチドが存在するかどうかは全く知られていない。

一方、多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7 TMR)と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生

体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列が

5 Expressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

そこで、未知のRFamide様構造を持つポリペプチド（ペプチド）、または未知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を見出し、それらを利用した新たな生理活性物質を含有してなる疾患の予防・治療・診断剤の開発が望まれていた。

10

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、EST等の配列情報を基にプライマーを作製し、ヒト胎児脳 poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とするRT-PCRにより、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者ら

15 は、得られたcDNAにコードされるポリペプチドが有用なC末端がLPL RFamide様、LPL RSamide様、LPQ RFamide様またはLPLRLamide様のペプチドであることを見出した。

また、本発明者らは、degenerated PCR法によって作成したEST情報に基づいて、ラット脳幹周辺部およびヒト視床下部由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。

さらに、本発明者らは、鋭意検討を重ね、上記RFamide様ポリペプチド等が上記G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対してリガンド活性を有することを見出した。

25

これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

5 (2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(3) 上記(1)記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

10 (4) 配列番号：1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(5) 配列番号：1の第101番目(Ser)ないし第112番目(Ser)のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

15 (6) 配列番号：1の第124番目(Val)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(7) 上記(1)記載のポリペプチドの部分ペプチドのアミドまたはその塩、

20 (8) 上記(1)記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(9) 配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表される塩基配列を有する上記(8)記載のDNA、

(10) 上記(3)記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

25 (11) 配列番号：2で表される塩基配列の第241番目ないし第276番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

(12) 配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第336番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

(13) 配列番号：2で表される塩基配列の第370番目ないし第393番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

5 (14) 上記(8)または上記(10)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(15) 上記(14)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(16) 上記(15)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(3)記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

10

(17) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

15

(18) 上記(8)もしくは上記(10)記載のDNAまたは上記(17)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(19) 上記(8)または上記(10)記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、

20

(20) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤、

(21) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

25

(22) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもし

くはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２３）上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記（２２）記載のスクリーニング方法、

（２４）上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（２５）上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するする蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記（２４）記載のスクリーニング用キット、

（２６）上記（２２）記載のスクリーニング方法または上記（２４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

（２７）上記（２２）記載のスクリーニング方法または上記（２４）記載のスクリーニング

用キットを用いて得られる上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- 5     （２８）配列番号：３７で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、

（２９）配列番号：３７で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：５４で表されるアミノ酸配列である上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、

- 10    （３０）上記（２８）記載の蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（３１）上記（２８）記載の蛋白質または上記（３０）記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

（３２）配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表される塩基配列を有する上記（３１）記載のDNA、

- 15    （３３）上記（３１）記載のDNAを含有する組換えベクター、

（３４）上記（３３）記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

（３５）上記（３４）記載の形質転換体を培養し、上記（２８）記載の蛋白質または上記（３０）記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、または上記（３０）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはその  
20    エステルまたはその塩の製造法、

（３６）上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、または上記（３０）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

（３７）上記（３１）記載のDNAまたは上記（３６）記載の抗体を含有してなる診断薬、

- 25    （３８）上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、または上記（３０）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることにより得られる上記（２８）記載の蛋白質またはその塩に対するリガンド、

(39) 上記(28)記載の蛋白質またはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(28)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

5 (40) 上記(28)記載の蛋白質またはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(28)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (41) 上記(28)記載の蛋白質またはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(28)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(42) 上記(40)記載のスクリーニング方法または上記(41)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(28)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

15 (43) 上記(40)記載のスクリーニング方法または上記(41)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(28)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

(44) 上記(36)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(28)記載の蛋白質またはその塩の定量方法などに関する。

20 さらに、本発明は、

(45) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

25 (46) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号

：50で表されるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列中の1～20個以上（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個以上、より好ましくは、1～3個以上）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（47）上記（8）または（10）記載のDNAをコードする塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

（48）上記（47）記載のDNAを含有する組換えベクター、

（49）上記（48）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（50）上記（49）記載の形質転換体を培養し、上記（47）記載のDNAにコードされるポリペプチドを生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記（47）記載のDNAでコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

（51）上記（50）記載の製造法で製造される、上記（47）記載のDNAでコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（52）配列番号：37で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を



有するアミノ酸配列である上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、

（５３）配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：３７で表されるアミノ酸配列中の１～２０個（好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～５個、より好ましくは、１～３個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：３７で表されるアミノ酸配列に１～２０個（好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～５個、より好ましくは、１～３個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：３７で表されるアミノ酸配列中の１～２０個以上（好ましくは１～１５個、さらに好ましくは１～５個以上、より好ましくは、１～３個以上）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記（２８）記載の蛋白質またはその塩、

（５４）上記（３１）記載のDNAをコードする塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

（５５）上記（５４）記載のDNAを含有する組換えベクター、

（５６）上記（５５）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（５７）上記（５６）記載の形質転換体を培養し、上記（５４）記載のDNAにコードされるポリペプチドを生成し、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記（５４）記載のDNAでコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

（５８）上記（５７）記載の製造法で製造される、上記（５４）記載のDNAでコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（５９）（i）上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体を接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体および試験化合物を接触させた場合における、上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはその

エステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を測定し、比較することを特徴とする上記（２２）記載のスクリーニング方法、

（６０）受容体が配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなる蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である上記（５９）記載のスクリーニング方法、

（６１）上記（２２）記載のスクリーニング方法または上記（２４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（６２）上記（２２）記載のスクリーニング方法または上記（２４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（６３）上記（１７）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法、

（６４）被検液と担体上に不溶化した上記（１７）記載の抗体および標識化された上記（１７）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミ

もしくはそのエステルまたはその塩の定量法、

(65) 上記(36)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(28)記載の蛋白質またはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(28)記載の蛋白質またはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(28)記載の蛋白質またはその塩、上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法、および

(66) 被検液と担体上に不溶化した上記(36)記載の抗体および標識化された上記(36)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(28)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(30)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法などを提供する。

#### 15 図面の簡単な説明

図1は実施例2で得られた本発明のポリペプチド(ヒト型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図2は本発明のポリペプチドの疎水性プロットを示す図を示す。

図3は実施例3で得られた本発明のポリペプチド(ヒト型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図4は実施例4で得られた本発明のポリペプチド(ウシ型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図5は実施例5で得られた本発明のポリペプチド(ラット型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図6は実施例3、4、5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の比較を示す。

図7は実施例6で得られた本発明のポリペプチド(マウス型)のアミノ酸配列および該ポ

リペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

図8は実施例7で行われたサイトセンサーによる r0T7T022 L受容体発現CHO細胞に対するペプチドの反応性を示す図を示す。図中、●—●はMPHSFANLPLRFamide (配列番号：39)、△—△はVPNLPQRFamide (配列番号：40)を示す。

- 5 図9は実施例10で行われた MPHSFANLPLRFamide (配列番号：39)、VPNLPQRFamide (配列番号：40) の r0T7T022L 発現 CHO 細胞に対する cAMP 産生抑制活性を示す図を示す。図中、□—□は MPHSFANLPLRFamide (配列番号：39)、●—●は VPNLPQRFamide (配列番号：40)を示す。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEH

15  
20  
25 I-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2

, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第22～180番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列など）を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの受容体（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩）を発現する細胞に添加することにより発現する細胞刺激活性（（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、C-fos の活性化、細胞外 pH の変動など）またはソマトスタチン分泌調節活性などがあげられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。従って、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性などの活性が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～

2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

細胞刺激活性などの測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

- 5      また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、①配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸  
10    配列に1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1、配列番号：8、配  
15    列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。

- 20    上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

- 25    配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：50で表わ

されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列

5 含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

10

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

15

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

20

25

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配

列を有するヒト由来のポリペプチド（図1）、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド（図3）、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するウシ由来のポリペプチド（図4）、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のポリペプチド（図5）、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチド（図7）、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のポリペプチドなどが用いられる。

また、本発明のポリペプチドは下記の部分ペプチドの前駆体であってもよく、この場合には、必ずしも下記の部分ペプチドの有する活性（例、細胞刺激活性など）を有する必要はない。

10 本発明のポリペプチドの部分ペプチドとしては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドであって、好ましくは、本発明のポリペプチドの部分ペプチドの受容体（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩）を発現する細胞に添加することにより発現する細胞刺激活性（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の磷酸化、C-fos の活性化、細胞外 pH の変動など）またはソマトスタチン分泌調節活性などを有するものであればいかなるものでもよい。

本発明のポリペプチドの部分ペプチドとして好ましくは、R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチドが好ましい。

20 R F amide 構造とは、ペプチドのC末端が Arginine（アルギニン）-Phenylalanine（フェニルアラニン）- $\text{NH}_2$  構造になっていることをいい、R S amide 構造とは、ペプチドのC末端が Arginine（アルギニン）-Serine（セリン）- $\text{NH}_2$  構造になっていることをいい、R L amide 構造とは、ペプチドのC末端が Arginine（アルギニン）-Leucine（ロイシン）- $\text{NH}_2$  構造になっていることを意味する。

25 これらペプチドの中でも、例えば、

① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）、第



101番目 (Ser) ～112番目 (Ser)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～112番目 (Ser)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

④ 配列番号：33で表わされるアミノ酸配列の第84番目 (Pro) ～第94番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

⑤ 配列番号：50で表わされるアミノ酸配列の第84番目 (Pro) ～第94番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、などが好ましい例としてあげられる。

15 特にこれらのペプチドのアミド体が好ましい。

具体的には配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-CONH_2$ ) ペプチド (配列番号：39)、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～112番目 (Ser) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-CONH_2$ ) ペプチド (配列番号：41) および配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-CONH_2$ ) ペプチド (配列番号：40) などがあげられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1～5個 (好ましくは、1～3個) のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1～5個 (好ましくは、1～3個) のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1～5個 (好ましくは、1～3個) のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個 (好ましくは、1～3個) のアミノ酸が

他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有していてもよく、それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有していてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基 ( $-COOH$ ) またはカルボキシレート ( $-COO^-$ ) であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) ( $R$ は上記と同意義を示す) であつてもよい。なかでも、C末端がアミド ( $-CONH_2$ ) であるものが好ましい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のポリペプチドと同様に、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性などを有する必要はない。

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルの塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸、有機酸) や塩基 (例、アルカリ金属塩) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタン

スルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン

交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチド、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラ

ヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

- 10 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、*t*-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

- カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $\text{C}_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベ

ンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 5 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用い
- 10 られる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離
- 15 反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェ
- 20 ニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、
- 25 反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば

、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luecke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④ 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、  
5 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。  
10

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

15 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質  
20 の活性（例、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の  
25 の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる



塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAでコードされるポリペプチドは後述の本発明のポリペプチドの製造法と同様にして製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明のポリペプチドのアミド、エステル、塩と同様のものなどがあげられる。

また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、

① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～第112番目 (Ser)、第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～第112番目 (Ser)、第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有す

るDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe) または第  
5 1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

④ 配列番号：33で表わされるアミノ酸配列の第84番目 (Pro) ～第94番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、  
10 またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

⑤ 配列番号：50で表わされるアミノ酸配列の第84番目 (Pro) ～第94番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、  
15 Aを含有するDNA、

などがあげられる。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：42で表される塩基配列を有するDNA (配列番号：2で表される塩基配列  
20 の第241番目ないし第276番目の塩基を有するDNA) を含有するDNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～112番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：43で表される塩基配列を有するDNA (配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第336番目の塩基を有するDNA) を含有するDNA、

25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとし

ては、配列番号：44で表される塩基配列を有するDNA（配列番号：2で表される塩基配列の第370番目ないし第393番目の塩基を有するDNA）を含有するDNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては

5、配列番号：45で表される塩基配列を有するDNA（配列番号：2で表される塩基配列の第1番目ないし第276番目の塩基を有するDNA）を含有するDNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～112番目（Ser）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、

10、配列番号：46で表される塩基配列を有するDNA（配列番号：2で表される塩基配列の第1番目ないし第336番目の塩基を有するDNA）を含有するDNA、および

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：47で表される塩基配列を有するDNA（配列番号：2で表される塩基配列の第1番目ないし第393番目の塩基を有するDNA）を含有するDNAなどがあげられる

15。

本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチド、後述の本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドおよびこれらの蛋白質またはペプチドをコードするDNAは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたものまたは

20は酵素標識されたものなどがあげられる。

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知

25のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識し

たものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って  
5 行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-G (宝酒造 (株))、Mutant<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex 法や Kunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAは  
10 その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコード  
15 するDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなど  
20 の他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は  
25 、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2  
5 プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が  
15 あげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2  
20 ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクター  
25 を用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物

細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

10    バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シノサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞C

HO（以下、CHO細胞と略記）， $dhfr$ -遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO（ $dhfr^-$ ）細胞と略記），マウスL細胞，マウスAtT-20，マウスミエローマ細胞，ラットGH3，ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），69巻，2110（1972）やジーン（Gene），17巻，107（1982）などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics），168巻，111（1979）などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），194巻，182-187（1991）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），75巻，1929（1978）などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology，6，47-55（1988））などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル，263-267（1995）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology），52巻，456（1973）に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、

コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- 5     エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433 , Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤
- 10    を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 15    宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330(1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 20

- 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加
- 25



える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻, 501(1952)〕, D MEM培地〔ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培  
5 地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシージ  
ング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。  
pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行な  
10 い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

15 本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい  
20 。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲル  
25 ろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティ

ークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の受容体（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）として具体的には、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などがあげられる。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、

嗅球、扁頭核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましく、具体的には、配列番号: 54で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用またはソマトスタチン分泌調節活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用またはソマトスタチン分泌調節活性などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用またはソマトスタチン分泌調節活性などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号: 37または配列番号: 54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましく

は1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラールキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成した

グルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のレセプター蛋白質、配列番号：54で表されるヒト由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個

以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1または2個）、）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。

さらに、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体（宿主は前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の宿主と同様のものなどが用いられる。）を前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の作製方法に準じて作製し、前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の培

養方法に準じて培養することによっても製造することができる。また、前述のポリペプチド合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、前述の自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

10 本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の合成は上述の本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩における合成方法と同様の方法により合成することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

20 本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997 記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記し

た細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA としては、例えば、配列番号  
5 : 38、配列番号 : 55 または配列番号 : 56 で表わされる塩基配列を含有する DNA、  
または配列番号 : 38、配列番号 : 55 または配列番号 : 56 で表わされる塩基配列とハイ  
ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質  
と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用またはソマトスタチ  
ン分泌調節活性など) を有するレセプター蛋白質をコードする DNA であれば何れのもので  
10 もよい。

配列番号 : 38、配列番号 : 55 または配列番号 : 56 で表わされる塩基配列とハイブリ  
ダイズできる DNA としては、例えば、配列番号 : 38、配列番号 : 55 または配列番号 :  
56 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 9  
0% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが  
15 用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキ  
ュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor  
Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラ  
リーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好  
20 ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM、好ま  
しくは約 19~20 mM で、温度が約 50~70℃、好ましくは約 60~65℃ の条件を示  
す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65℃ の場合が最も好ましい。

配列番号 : 38、配列番号 : 55 または配列番号 : 56 で表わされる塩基配列とハイブリ  
25 ダイズできる DNA でコードされるポリペプチドは上述の本発明のポリペプチドの製造法と  
同様に製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明の



ポリペプチドのアミド、エステル、塩と同様のものなどがあげられる。

より具体的には、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：38で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

10 本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができる

15 か、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するの

20 に有用であり、また後述の疾患などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6ーベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペ

25 プチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3

’ 端パリンドローム領域、及び3’ 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用またはソマトスタチン分泌調節活性など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルに対する抗体は、本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルに対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、またはその

部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルに対する抗体（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

5   〔モノクローナル抗体の作製〕

    (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを  
10   投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取  
15   し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、  
20   ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（  
25   好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく

細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

10     モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

## 20     (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離  
5 精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法  
10 が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは  
20 血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたは本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA（以下、アンチセンスDNAの説明においては、こ  
25

これらのDNAを本発明のDNAと略記する) としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列 (すなわち、本発明のDNAの相補鎖) の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のN末端部位をコードする部分の塩基配列 (例えば、開始コドン付近の塩基配列など) の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、①本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩 (以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある)、②本発明のレセプター蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩 (以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある)、③本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドをコードするDNA (以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルに対する抗体 (以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

(1) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質が関与する各種疾病の治療・  
25 予防剤

本発明のポリペプチドは本発明のレセプター蛋白質の細胞刺激活性などを有しているので

、本発明のポリペプチドをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、または本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、頻尿、尿毒症、または神経変成疾患等の種々の疾病が発症する可能性が高い。従って、本発明のポリペプチド、本発明のレセプター蛋白質および本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

また、本発明のポリペプチド、本発明のレセプター蛋白質および本発明のDNAはMACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のポリペプチド、本発明のレセプター蛋白質および本発明のDNAはソマトスタチンの分泌制御（分泌調節ともいう。以下同じ。）に関与しているため、例えば、（

- 1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性ACTH（アドレノコルチコトロピン）産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、（2）インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち
- 5 糖尿病合併症（例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など）の治療薬、（3）高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、（4）急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、（5）ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤（例、ガストリン分泌促進の抑制剤など）、（6）内
- 10 視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、（7）小腸の吸収能低下、分泌促進または消化管の運動能異常に起因する下痢（例、Short bowel 症候群など）、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢など
- 15 の治療薬、（8）ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、（9）腫瘍または癌（例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など）、白血病（例、好塩基性白
- 20 血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など）などの治療薬；該治療薬は、単独または他の制癌剤（例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン-2など）と併用して用いることができる、（10）肥大型心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞（特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞）、再血管形成の予防・治療
- 25 薬、（11）食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、（12）免疫系に作用する生理活性物質（例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど）の分泌の調節作用に



基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患（例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー（例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など）など）の治療薬、（13）神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症（例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など）、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、（14）眼疾患（例、緑内障など）などの治療薬、（15）急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、（16）臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、（17）慢性あるいは急性疼痛（例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患（例、関節炎、リュウマチ、骨粗鬆症など））にともなう疼痛の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質が減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に

投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

5 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

10 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

15 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合に  
20 は、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

25 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例

例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

10 本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

15 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき該ポリペプチドまたは蛋白質を約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチドまたは蛋白質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を注射剤の形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該ポリペプチド等を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

## 25 (2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に対する細胞刺激活性などを有す

るため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（本発明のポリペプチドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩ともいう。以下同じ。）は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘带状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、頻尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（好ましくは、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能（例、細胞刺激活性など）を阻害する化合物またはその塩）は MACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質はソマトスタチンの分泌

制御に関与しているため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、（１）先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性ACTH（アドレノコルチコトロピン）産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、（２）インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症（例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など）の治療薬、（３）高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、（４）急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、（５）ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤（例、ガストリン分泌促進の抑制剤など）、（６）内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、（７）小腸の吸収能低下、分泌促進または消化管の運動能異常に起因する下痢（例、Short bowel症候群など）、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髓移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、（８）ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、（９）腫瘍または癌（例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など）、白血病（例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など）などの治療薬；該治療薬は、単独または他の制癌剤（例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン $\gamma$ など）と併用して用いることができる、（１０）肥大型心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞（特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞）、再血管形成の予防・治療薬、（１

1) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14) 眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髓損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治療などにも用いられ、(17) 慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リュウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

従って、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能(例えば、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など)を促進する化合物もしくはその塩(以下、

促進剤と略記する場合がある)、または本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、また、

- 5 (2) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能(例えば、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など)を促進する化合物もしくはその塩(以下、促進剤と略記する場合がある)、または本発明のレセプター蛋白質
- 10 白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

- (3) 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および本発明のレセプ
- 15 ター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩(具体的には、配列番号: 37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩)を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能(例えば、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など)を促進する化合物もしくはその塩(以下、促進剤と略記する場合がある)、または本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能(例えば、細
- 20
- 25

胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など）を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、

（３）（ｉ）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（具体的には、配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）を接触させた場合と、（ｉｉ）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（具体的には、配列番号：３７で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）および試験化合物を接触させた場合における、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能（例えば、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など）を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能（例えば、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など）を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法などを提供する。



具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のポリペプチドおよび試験化合物の細胞刺激活性または本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量などを測定して、比較することを特徴とするものである。

5 本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などは、自体公知の方法、例えば、Dockray, G. J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983, Fukusumi, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 232, 157-163, 1997, Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998, Tatemoto, K., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471-476, 1998. などに記載の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。

10 本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量は、後述の「本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定」に記載した方法に準じて測定することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

15 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のポリペプチドを、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチドの標品を調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどの、本発明のポリペプチドと本発明のレセプター蛋白質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

例えば、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などを促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などを阻害する化合物として選択することができる。

また、これらの試験を行う前に、後述の「本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定」に記載した①～③の方法またはそれに準じた方法により試験を行い、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認することが好ましい。

さらに、上記の試験化合物が本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する一つの指標としては、本発明のレセプター蛋白質と本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの標識体との結合を阻害する活性があげられる。例えば Hosoya, M et al. Biochem Biophys. Res. Commun. 194(1), 133-143, 1993 に記載されているような結合試験系において、 $1 \times 10^{-2}$  M以下の濃度で標識体の結合を 10%以上阻害する試験化合物は本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩である可能性が高いと考えられる。但し、結合阻害活性は標識体の結合をもとに測定した相対的な値であるため、上記の試験化合物が本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する上で必須ではない。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットは本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の受容体、即ち、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）をさらに含有するものが好ましい。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ②レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## ③標識リガンド

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルの水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

## ④リガンド標準液

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 15 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3}$ ~ $10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5  $\mu\text{l}$ 加えた後、標識リガンドを5  $\mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5  $\mu\text{l}$ 加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

5 B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能（例、細胞刺激活性またはソマトスタチン分泌調節活性など）を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシ  
15 ル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（6  
25 0kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投

与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の定量法を提供す

る。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

5      また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

10      本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、  
15      いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることも  
20      できる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチド

あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

5      サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量または本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免  
10    疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発  
15    明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

20    本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性  
25    抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性の

ものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質



- の濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の濃度の減少または増加が検出された場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、
- 5 バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒト
- 10 トパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、
- 15 末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、頻尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。
- 20 また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の濃度の減少または増加が検出された場合、MACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。
- さらに、本発明のポリペプチド、本発明のレセプター蛋白質および本発明のDNAはソマトスタチンの分泌制御に関与しているため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター
- 25 蛋白質の濃度の減少または増加が検出された場合、例えば、（1）先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性ACTH（アドレノコルチコトロピン）

産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイド、(2) インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)、(3) 高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症、(4) 急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎、(5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状、(6) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌過剰、(7) 小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髓移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、(9) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)、(10) 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、(11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患、(12) 全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)、(13) 痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症、(14) 眼疾患(例、緑内障など)、(15) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症

、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎、（１６）火傷、創傷、脱毛症、（１７）慢性あるいは急性疼痛（例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患（例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など））にともなう疼痛）等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

#### （４）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過多が検出された場合は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性

心筋梗塞, 急性膵炎, 急性ウイルス脳炎, 成人呼吸促迫症候群, アルコール性肝炎, アルツハイマー病, 喘息, 動脈硬化, アトピー性皮膚炎, バクテリア肺炎, 膀胱がん, 骨折, 乳がん, 過食症, 多食症, 火傷治癒, 子宮頸部がん, 慢性リンパ性白血病, 慢性骨髄性白血病, 慢性膵炎, 肝硬変, 大腸がん (結腸/直腸がん), クローン病, 痴呆, 糖尿病性合併症, 糖尿病性腎症, 糖尿病性神経障害, 糖尿病性網膜症, 胃炎, ヘリコバクター・ピロリ感染症, 肝不全, A型肝炎, B型肝炎, C型肝炎, 肝炎, 単純ヘルペスウイルス感染症, 水痘带状疱疹ウイルス感染症, ホジキン病, エイズ感染症, ヒトパピローマウイルス感染症, 高カルシウム血症, 高コレステロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症, インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病 (I 型), 侵襲性ブドウ球菌感染症, 悪性黒色腫, がん転移, 多発性骨髄腫, アレルギー性鼻炎, 腎炎, 非ホジキン性リンパ腫, インシュリン非依存性糖尿病 (II 型), 非小細胞肺がん, 臓器移植, 骨関節炎, 骨軟化症, 骨減少症, 骨粗鬆症, 卵巣がん, 骨ペーチェット病, 消化性潰瘍, 末梢血管疾患, 前立腺がん, 逆流性食道炎, 腎不全, リウマチ関節炎, 精神分裂症, 敗血症, 敗血症ショック, 重症全身性真菌感染症, 小細胞肺がん, 脊髄損傷, 胃がん, 全身性エリテマトーサス, 一過性脳虚血発作, 結核, 心弁膜症, 血管性/多発梗塞痴呆, 創傷治癒, 不眠症, 関節炎, 下垂体ホルモン分泌不全, 瀕尿, 尿毒症, または神経変成疾患等である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過剰が検出された場合、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫) 等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

さらに、本発明のポリペプチド、本発明のレセプター蛋白質および本発明のDNAはソマトスタチンの分泌制御に関与しているため、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過剰が検出された場合、例えば、(1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性 (非機能性) 下垂体腫瘍、異所性ACTH (アドレノコルチコトロピン) 産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイド、(2) インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連し

- た種々の疾患、すなわち糖尿病合併症（例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など）、（３）高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症、（４）急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎、（５）ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状、（６）内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌過剰、（７）小腸の吸収能低下、分泌亢進または消化管の運動能異常に起因する下痢（例、Short bowel症候群など）、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢、（８）ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、（９）腫瘍または癌（例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など）、白血病（例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など）、（１０）肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞（特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞）、（１１）食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患、（１２）全身性または局所性の炎症に伴う疾患（例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー（例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など）など）、（１３）痴呆症（例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など）、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症、（１４）眼疾患（例、緑内障など）、（１５）急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症

、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎、（16）火傷、創傷、脱毛症、（17）慢性あるいは急性疼痛（例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患（例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など）にともなう疼痛）等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

5      （5）アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、

10      高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤として使用することができる。

25      また、本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAはMACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）の疾病の治療・予防剤などの医

薬として使用することができる。

さらに、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質はソマトスタチンの分泌制御に関与しているため、本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、(1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性

- 5 (非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高イン
- 10 スリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4)急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5)ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分泌促進の抑制剤など)、(6)内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌促進または消化
- 15 管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8)ダンピング症候群、過敏性
- 20 大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬;該治療薬は、単独ま
- 25 たは他の制癌剤(例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン-2など)と併用して用いることがで

きる、(10) 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14) 眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17) 慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リュウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

20 上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルに



よって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

- 5 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。
- 10
- 15
- 20

- 25 また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は MACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質はソマトスタチンの分泌制御に関与しているため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、（１）先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性ACTH（アドレノコルチコトロピン）産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、（２）インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症（例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など）の治療薬、（３）高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、（４）急性  
5 膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、（５）ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤（例、ガストリン分泌促進の抑制剤など）、（６）内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、（７）小腸の吸収能低下、分泌促進または消化管の運動能異常に起因する下痢（例、Short bowel症候群など）、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経  
15 内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、（８）ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、（９）腫瘍または癌（例、甲状腺癌  
20 、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など）、白血病（例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など）などの治療薬；該治療薬は、単独または他の制癌剤（例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト  
25 、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン-2など）と併用して用いることができる、（１０）肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞（特に、経皮経管冠動

- 脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14) 眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髓損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17) 慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リュウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

- 本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の神経疾患患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準

ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カ

プセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

- 5   なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

（7）DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

- 10   すなわち、本発明は、

- （1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- （2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）記載の動物、
- （3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第（2）記載の動物、および
- （4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる

- 15   組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、

- 20   電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。
- 25

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モ

ルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

- 10 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 15 該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

- 20 本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

- 25 本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血

病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シ

ミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および



体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能亢進症や、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚

芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができ

5 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

10 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

15 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

20 また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質により特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性

25 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に

培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- 5      さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症などを含み、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。
- 15

- さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。
- 20

#### (8) ノックアウト動物

- 25      本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、

5 (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、

(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、

(5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、

(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

10 (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、

(9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および

15 (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の活性を20 実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドのまたは本発明のレセプター蛋白質発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により  
25 該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモー

ターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、  
5 目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列  
10 （例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター  
15 上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufman の方法に  
20 準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス（C57BL/6とDBA/2とのF1）を用いて樹立したものなども良好に用いる。  
25 BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデル

マウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得

5 することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の  
10 遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

15 また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

20 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000$  U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播  
25

種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年]、本発明の ES 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

15 該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明の DNA と入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明の DNA をノックアウトさせることができる。

本発明の DNA がノックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。

25 非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明の DNA が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8 細胞期の非ヒト

哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

5 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

20 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。



また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- 5 (8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 15 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 25 例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツ

ハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、

- 5 肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘带状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非
- 10 依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全
- 15 、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等に対して治療・予防効果を有する化合物、または MACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）に対して治療・予防効果を有する化合物、さらには、

- （1）先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性ACTH（アドレノコルチコトロピン）産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、（2）インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症（例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など）の治療薬、（3）高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、（4）急性脾炎、慢性脾炎、脾臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、（5）ヘリコバクター・
- 25 ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤（例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など）、（6）

内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、

- (7) 小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel 症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する
- 5 下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫
- 10 、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬；該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン-2など)と併用して用いることができる、(10) 肥大型心筋症、動脈硬化症、
- 15 心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー
- 20 性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14) 眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結
- 25 核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性

骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16)臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤等をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

15 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物

では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA領域  
5 の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の発現する組織で、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分  
10 ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、*lacZ*をコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

20 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リ  
25 ンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、  
本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の発現を促進または阻害し、該ポリ  
ペプチドまたはレセプター蛋白質の機能を促進または阻害することができるので、例えば、  
5 高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、  
急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病  
、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症  
、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、  
肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症  
、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A  
10 型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘带状疱疹ウイルス  
感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、  
高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、イ  
ンシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多  
発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿  
15 病（II型）、非小細胞肺癌がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣  
がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全  
、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞  
肺癌がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症  
、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、頻尿、尿  
20 毒症、または神経変成疾患等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として  
有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその  
塩は、MACULAR EDEMA CYSTOID（嚢胞状黄斑浮腫）に対する安全で低毒性な治療・予防剤など  
の医薬として有用である。  
25 さらに、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその  
塩は、（1）先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性（非機能性）下垂体腫瘍、異所性AC

TH.(アドレノコルチコトロピン) 産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2) インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3) 高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4) 急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分泌促進の抑制剤など)、(6) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7) 小腸の吸収能低下、分泌促進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬；該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフェン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン-2など)と併用して用いることができる、(10) 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュ



ウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー（例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など）などの治療薬、（１３）神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症（例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など）、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、（１４）眼疾患（例、緑内障など）などの治療薬、（１５）急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ＡＩＤＳ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ペーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、（１６）臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、（１７）慢性あるいは急性疼痛（例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患（例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など）にともなう疼痛）の抑制・緩和など、鎮痛剤等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき該化合物を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。

非経口的に投与する場合は、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異

なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドまたは蛋白質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

(9) 発明のポリペプチドに対する受容体の同定

本発明のポリペプチドに対する受容体は次のようにして同定することができる。生理活性ペプチドの受容体の多くは7回膜貫通型受容体であり、現在リガンドが未知の多くのオーファン受容体が報告されている。従って、これらのオーファン受容体を CHO 細胞や HEK293 細胞など適当な細胞に発現させてそれらに本発明のポリペプチドを加えて、特異的なシグナル伝達を誘導するような細胞刺激活性を有するかどうかを調べることにより特異的な受容体を同定することができる。またゲノムあるいは cDNA ライブラリーを適当な動物細胞に導入してそれにラジオアイソトープを標識した本発明のポリペプチドを加えてその結合を調べることにより、受容体をコードする遺伝子を単離することができる。

- 10 さらに本発明は、生理活性ペプチドをコードする遺伝子はしばしばペプチドの配列モチーフが繰り返されるという特徴を利用して、未知の生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩を同定する方法、および該方法によって得られた生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩なども提供する。

- 生理活性ペプチドの有する配列モチーフとして、具体的には、例えば R F amide、R S amide、または R L amide 構造を有する本発明のポリペプチドの特徴的な配列である RFG (R/K) 配列または RSG (R/K) 配列または RLG (R/K) 配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列などがあげられる。このような短いアミノ酸配列をコードしうる DNA 配列は生理活性ペプチドの DNA 配列以外でも偶然にかなりの頻度で出現してくるが、このような配列が繰り返していることを特徴とする配列を探すことによりより高い確率で生理活性ペプチドをコードする DNA を見出すことができる。

- より具体的には、RFG (R/K) 配列または RSG (R/K) 配列または RLG (K/R) 配列または該アミノ酸配列を含有する配列およびそれをコードする塩基配列を含有する配列をプローブとしてデータベースの検索をすることにより目的とする遺伝子を取得することができる。該プローブとしては、例えば、ペプチドの配列として RFG (K/R)、RSG (K/R)、RLG (K/R) に対応する DNA の配列として、

25 RFGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 20)

RFGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 1)

RSGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 2 2)

RSGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 3)

5 RL GK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 2 4)

RLGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 5) などがあげられる。

さらに、該配列モチーフを用いて cDNA あるいはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより目的とする遺伝子を取得することもできる。またジーントラッパーのように上記プローブを使って目的の遺伝子の mRNA を精製し、その mRNA から cDNA を取得することもできる。さらに他の配列モチーフ（繰り返して遺伝子にコードされているアミノ酸配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列など）を用いて R F amide、R S amide または R L amide 構造以外の生理活性ペプチドの同定にも使うことができる。

さらに R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチドはペプチドの C 末端

15 側に R F amide、R S amide または R L amide 構造の共通構造を有しているので、R F amide、R S amide または R L amide 構造を含む抗体を使って、未知の R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチドを探索することが可能である。また、R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチドの受容体の多くは 7 回膜貫通型受容体である。従って、抗 R F amide 抗体、抗 R S amide 抗体または抗 R L amide 抗体を使って濃縮あるいは分画した動物組織抽出物をリガンドが決定していないオーファン受容体発現細胞に加えて、そのシグナル伝達を調べることにより、オーファン受容体のリガンドを決定することができる。R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチド以外にも共通配列を有するペプチドは数多く存在するので、この方法は R F amide、R S amide または R L amide 構造を有するペプチド以外のペプチドにも使うことができる。

25 (10) 本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプター蛋白質は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド

(アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビ  
5 ノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、  
オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴ  
ン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、  
GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポ  
リペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGR  
10 P（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン  
、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカ  
イン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、EN  
A-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-30  
9、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログاستリン  
15 、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラ  
ニンなど）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、  
ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物  
、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しなが  
ら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

20 具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の本発明のレセプター蛋白質を用いる  
か、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合  
アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例  
えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、  
細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化  
25 、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物  
（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）または

その塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質と試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該本発明のレセプター蛋白質に対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

5 より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

10 ②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とする  
15 本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する  
20 活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する  
25

活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

- 5     まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが  
10    好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネイン  
15    プロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267 巻, 19555～19559 頁, 1992  
20    年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる  
25    場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドを決定する上記の①~③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシ



ン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、

5   ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、

10   エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセ

15   プター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプ

20   ター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3

25   時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\gamma$ -カウンター

で計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が 0 cpm を越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド (アゴニスト) として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても

RF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド  
 リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラ  
 ジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パ  
 ンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$   
 5 および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、  
 NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MC  
 P-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エ  
 ンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペ  
 タイド、ガラニンなどが用いられる。

- 10 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-  
 IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣  
 用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る  
 場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
15	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
20	I	: イノシン
	R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
	Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
	M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
	K	: グアニン (G) またはチミン (T)
25	S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
	W	: アデニン (A) またはチミン (T)

良い。

## ②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個／穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## 5 ③標識試験化合物

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、

10 メタノール等に溶解する。

## ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

## 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、C

25

	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
5	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
10	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
15	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
20	p G l u	: ピログルタミン酸

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

後述の実施例1で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

[配列番号：2]

25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

- B : グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)  
D : アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)  
V : アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)  
N : アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしくは  
5                   チミン (T) または不明もしくは他の塩基
- RNA : リボ核酸  
mRNA : メッセンジャーリボ核酸  
dATP : デオキシアデノシン三リン酸  
dTTP : デオキシチミジン三リン酸  
10 dGTP : デオキシグアノシン三リン酸  
dCTP : デオキシシチジン三リン酸  
ATP : アデノシン三リン酸  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸  
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
- 15 BHA : ベンズヒドリルアミン  
pMBHA : p-メチルベンズヒドリルアミン  
Tos : p-トルエンスルフォニル  
Bzl : ベンジル  
Bom : ベンジルオキシメチル
- 20 Boc : t-ブチルオキシカルボニル  
DCM : ジクロロメタン  
HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
TFA : トリフルオロ酢酸
- 25 DIEA : ジイソプロピルエチルアミン  
Gly : グリシン

[配列番号：3]

後述の実施例1で用いられるプライマーF 5の塩基配列を示す。

[配列番号：4]

後述の実施例1で用いられるプライマーF 6の塩基配列を示す。

5 [配列番号：5]

後述の実施例1で用いられるプライマーF 1の塩基配列を示す。

[配列番号：6]

後述の実施例1で用いられるプライマーR 5の塩基配列を示す。

[配列番号：7]

10 後述の実施例3で用いられるプライマーh R 1の塩基配列を示す。

[配列番号：8]

後述の実施例3で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

[配列番号：9]

配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDN

15 Aの塩基配列を示す。

[配列番号：10]

後述の実施例4で用いられるプライマーb F 6の塩基配列を示す。

[配列番号：11]

後述の実施例4で用いられるプライマーb F 7の塩基配列を示す。

20 [配列番号：12]

後述の実施例4で用いられるプライマーb R 6の塩基配列を示す。

[配列番号：13]

後述の実施例4で用いられるプライマーb R 7の塩基配列を示す。

[配列番号：14]

25 後述の実施例4で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ウシ型）を示す。

[配列番号：15]

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

後述の実施例5で用いられるプライマー r L P R 1 の塩基配列を示す。

5   〔配列番号：17〕

後述の実施例5で用いられるプライマー r L P F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

後述の実施例5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング前）。

10   〔配列番号：19〕

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

R F G K配列をコードする塩基配列を示す。

15   〔配列番号：21〕

R F G R配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

R S G K配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

20   R S G R配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

R L G K配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

R L G R配列をコードする塩基配列を示す。

25   〔配列番号：26〕

後述の実施例6で用いられるプライマーFF2 の塩基配列を示す。



〔配列番号：27〕

後述の実施例6で用いられるプライマーrR4の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmF1の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：29〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

10 後述の実施例6で用いられるプライマーmoFの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmoRの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

後述の実施例6で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（マウス型）を示す。

15 〔配列番号：34〕

配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質r

20 OT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質r  
OT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の

25 塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r  
OT 7 T 0 2 2 Lのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r  
5 OT 7 T 0 2 2 LをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

後述の実施例7（3）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：40〕

後述の実施例7（4）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：41〕

後述の実施例7（5）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）のアミ  
ノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

15 〔配列番号：43〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～112番目（Ser）のア  
ミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目（Val）～131番目（Phe）のア  
ミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。  
20

〔配列番号：45〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目（Met）～第92番目（Phe）のアミ  
ノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～112番目（Ser）のアミ  
ノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

5 実施例5で用いられたプライマーratF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

実施例5で用いられたプライマーratRの塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

10 後述の実施例5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング後）。

〔配列番号：51〕

配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

15 実施例9で用いられたプライマーbFFの塩基配列を示す。

〔配列番号：53〕

実施例9で用いられたプライマーbFRの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

20 実施例11で得られたh OT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：55〕

配列番号：54で表されるアミノ酸配列を有するh OT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

25 配列番号：54で表されるアミノ酸配列を有するh OT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：57]

実施例11で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

[配列番号：58]

実施例11で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

- 5 後述の実施例2で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF1 は、1999年4月14日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6702として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年3月5日から寄託番号IFO 16265として寄託されている。

- 10 後述の実施例7で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH10B /pAK-rOT022Lは、1998年11月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6558として、1998年10月16日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16211として寄託されている。

- 15 後述の実施例9で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pbRF2 は、1999年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6811として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号IFO 16288として寄託されている。

- 20 後述の実施例8で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/phRF2 は、1999年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6812として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号IFO 16289として寄託されている。

- 25 後述の実施例6で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pmLP4 は、1999年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6813として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号IFO 16290として寄託されている。

後述の実施例5で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/prLPL6 は、1999年8

月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6814として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号IFO 16291として寄託されている。

5 後述の実施例11で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022T は、1999年11月8日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6930として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年10月27日から寄託番号IFO 16330として寄託されている。

10 後述の実施例11で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022G は、1999年11月8日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6931として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年10月27日から寄託番号IFO 16331として寄託されている。

### 実施例

15 以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

実施例1 ヒト胎児脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

20 クローンテック社より購入したヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分1  $\mu$ gにプライマーとしてOligo dTプライマー（Gibco BRL社）を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（Gibco BRL社）により、添付バッファーを用いてcDNAを合成した。反応後の産物はフェノール：クロロホルム（1：1）で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30  $\mu$ lのTEに溶解した。調製したcDNA 1  $\mu$ lを鋳型として、次の2つのプライマー（F5  
25 およびF6）を用いて、PCRによる増幅を行った。

F5 : 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' （配列番号：3）

F 6 : 5'-CTAGACCACCTCTATATAACTGCCCAT-3' (配列番号 : 4)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F 5およびF 6) 各20 pM、0.25mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファー 5  $\mu$ lで、総反応溶液量は50  $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー) を用い98℃・10秒、63℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。

さらにそのPCR産物の1  $\mu$ lを鋳型として次の2つのプライマー (F 1およびR 5) を用いて、nested PCRによる増幅を行った。

F 1 : 5'-GCACATAGAGACTTAATTTAGATTAGAC-3' (配列番号 : 5)

10 R 5 : 5'-CATGCACTTTGACTGGTTTCCAGGTAT-3' (配列番号 : 6)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F 1およびR 5) 各20 pM、0.25mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファー 5  $\mu$ lで、総反応溶液量は50  $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

20 実施例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を  
25 持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コ

り (*Escherichia coli*) JM109/p hRF1 を得た。

個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。決定した塩基配列を図1に示した。

- 10 決定した塩基配列を図1をもとにホモロジー検索と配列の解析を行った結果、形質転換体 *E. coli* JM109/p hRF1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。

実施例3 ヒト胎児脳cDNAからの生理活性ペプチドcDNAのスプライシングバリエーションの取得

実施例1で作製したヒト胎児脳cDNA 1 ml を鋳型として、次の二つのプライマー（F5、hR1）を用いてPCRによる増幅を行った。

F5: 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3'（配列番号：3）

hR1: 5'-CAGCTTTAGGGACAGGCTCCAGGTTTC-3'（配列番号：7）

- 20 反応液の組成は合成プライマー（F5 および hR1）各 20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 50 ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10 秒、65℃・20 秒、72℃・20 秒のサイクルを 40 回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR 産物の増幅を確認した後、反応産物を QIA quick PCR purification Kit（Quiagen）を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応は BigDye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit（ABI）を用いて行
- 25

い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。得られた塩基配列の情報解析はDNASIS (日立システムエンジニアリング) を用いて行った。その結果、実施例 2 で得られた cDNA と 3'末端側が異なる cDNA が得られた。したがって本実施例で得られた cDNA は、実施例 2 で得られた cDNA のスプライシングバリエーションである事が分かった。決定した塩基配列 (配列番号: 9) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 8) を図 3 に示す。

#### 実施例 4 ウシ視床下部 poly(A)<sup>+</sup>RNA からの生理活性ペプチド cDNA の取得

ウシ視床下部 poly(A)<sup>+</sup>RNA からのウシ型生理活性ペプチド cDNA の取得は Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kit に添付のマニュアルにしたがって作製した牛視床下部 cDNA を鋳型として、次の 4 つのプライマー (bF6、bF7、bR6、bR7) を合成し、Kit 添付の AP1、AP2 の二種類のプライマーと組み合わせて PCR による増幅を行った。

bF6: 5'-GCCTAGAGGAGATCTAGGCTGGGAGGA-3' (配列番号: 10)

bF7: 5'-GGGAGGAACATGGAAGAAGAAAGGAGC-3' (配列番号: 11)

bR6: 5'-GATGGTGAATGCATGGACTGCTGGAGC-3' (配列番号: 12)

bR7: 5'-TTCCTCCCAAATCTCAGTGGCAGGTTG-3' (配列番号: 13)

5'側 (N 末領域) の増幅のために、まず一回目の PCR 反応を合成プライマー (bR6 と AP1) を用いて行った。各プライマー 20pM と 0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃ 10 秒、72℃ 2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃ 10 秒、70℃ 2 分のサイクルを 5 回、98℃ 10 秒、68℃ 2 分 30 秒のサイクルを 25 回くりかえした。次にその一回目の PCR 反応液を 10 倍に希釈し、その 1 ml を鋳型にして (bR7 と AP2) プライマーにて二回目の PCR を行った。各プライマー 20pM と 0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃ 10 秒、72℃ 2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃ 10 秒、70℃ 2 分のサイクルを 5 回、98℃ 10 秒、68℃ 2 分 30 秒のサイクルを 35 回くりかえした。



3'側 (C 末領域) の増幅のために、まず一回目の PCR 反応を合成プライマー (bF6 と AP1) を用いて行った。各プライマー 20pM と 0.25mM dNTPs、Klen Taq polymerase 0.5ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10 秒、72℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて  
5 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、68℃・2 分 30 秒のサイクルを 25 回くりかえした。次にその一回目の PCR 反応液を 10 倍に希釈し、その 1 ml を鋳型にして (bF7 と AP2) プライマーにて二回目の PCR を行った。各プライマー 20pM と 0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10 秒、72  
10 ℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、68℃・2 分 30 秒のサイクルを 35 回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は 1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR 産物の増幅を確認した後、反応産物を QIA quick PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応は Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence  
15 Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動 Sequencer (ABI377) を用いて解読した。

得られた塩基配列の情報解析は DNASIS (日立システムエンジニアリング) を用いて行った。決定した塩基配列 (配列番号: 15) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 14) を図 4 に示す。

## 20 実施例 5 ラット脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA からの生理活性ペプチド cDNA の取得

ラット脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA からのラット型生理活性ペプチド cDNA の取得は Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kit に添付のマニュアルにしたがって作製したラット脳 cDNA を鋳型として、次の 2 つのプライマー

rLPR1: 5'-CCCTGGGGCTTCTTCTGTCTTCTATGT-3' (配列番号: 16)

25 rLPF1: 5'-AGCGATTCATTTTATTGACTTTAGCA-3' (配列番号: 17)

を合成し、Kit 添付の AP1, AP2 の二種類のプライマーと組み合わせて PCR による増幅を行っ

た。

5'側 (N 末領域) の増幅のために、まず一回目の PCR 反応を rLPRI と API のプライマーセットを用いて行った。各プライマー 200pM と各 0.1mM dNTP、Klen Taq DNA polymerase 0.25ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10 秒、72℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、68℃・2 分 30 秒のサイクルを 25 回くりかえした。次にその一回目の PCR 反応液を鋳型にして一回目のプライマーセット、同様の反応液組成にて二回目の PCR を行った。増幅のためのサイクルは、98℃・10 秒、72℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、(68℃・2 分 30 秒) のサイクルを 38 回くりかえした。

3'側 (C 末領域) の増幅のために、まず一回目の PCR 反応を rLPF1 と AP1 のプライマーセットを用いて行った。反応液組成は 5'側 (N 末領域) の増幅の場合と同様とした。増幅のためのサイクルは、98℃・10 秒、72℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、65℃・20 秒、72℃・2 分のサイクルを 25 回くりかえした。次にその一回目の PCR 反応液を鋳型にして rLPF1 と AP2 プライマーにて二回目の PCR を行った。反応液組成は一回目の PCR と同様とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10 秒、72℃・2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃・10 秒、70℃・2 分のサイクルを 5 回、98℃・10 秒、65℃・20 秒、72℃・2 分のサイクルを 38 回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は 1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR 産物バンドを QIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は実施例 3 と同様の方法で行った。決定した塩基配列 (配列番号: 19) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 18) を図 5 に示す。さらにこの配列をもとに、開始コドンと終止コドンの周辺に 2 本のプライマー

ratF2: 5'-AATGGAAATTATTTTCATCAAAGCGATTCAT-3' (配列番号: 48)

ratR: 5'-CACCTATACTGACAGGAATGATGGCTCTCC-3' (配列番号: 49)

を合成した。ラット視床下部 poly(A)<sup>+</sup>RNA より AMV reverse transferase (宝酒造) と random 9 mer (宝酒造) を用いて合成した cDNA を鋳型として 98℃・10 秒、68℃・40 秒のサイクルを 33 回くりかえす PCR 反応を行った。さらにこの反応液を鋳型として 98℃・10 秒、68℃・1 分のサイクルを 38 回くりかえす PCR 反応を行い、約 690 bp の PCR 産物を得た。これを TA cloning Kit (Invitrogen) のマニュアルにしたがってクローニングベクター pCR2.1 TOPO へ導入、大腸菌 JM109 に導入して形質転換体 E. coli JM109/prLPL6 を得た。実施例 3 と同様の方法で塩基配列を決定し (配列番号: 51)、アミノ酸配列 (配列番号: 50) を予測した。

10 実施例 6 マウス脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA からの Marathon PCR 法によるマウス型生理活性ペプチド cDNA の取得と配列確認

マウス脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA からマウス型生理活性ペプチド cDNA を取得するため、まずマウス脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μg を oligo d(T) primer 2.5 pmol (宝酒造)、0.5 mM dNTPs、10 mM DTT 存在下で、SuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素 (GIBCO BRL) により、42℃、1 時間の反応で cDNA を合成した。これを鋳型として、プライマー

FF2: 5'-GACTTAATTTTAGATTAGACAAAATGGAA-3' (配列番号: 26)

rR4: 5'-TTCTCCCAAACCTTTGGGGCAGGTT-3' (配列番号: 27)

および、KlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10 秒、56℃ 20 秒、72℃ 25 秒のサイクルを 39 回くりかえす PCR 反応を行った。さらに同じプライマーセットを用いて 98℃ 10 秒、60℃ 20 秒、72℃ 25 秒のサイクルを 25 回くりかえす PCR 反応を行い、増副産物を 2% アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出して、そのバンドを QIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、実施例 3 と同様の方法で塩基配列を決定した。得られたマウス型生理活性ペプチド cDNA 断片の 5' および 3' 側の配列を取得するため、実施例 5 と同様に、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いてマウス脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μg から cDNA を合成し、鋳型とした。次の 3 つのプライマ

m F1 : 5'-ACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAATACTC-3' (配列番号 : 28)

m F3 : 5'-ATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGAGCAC-3' (配列番号 : 29)

m R1 : 5'-GTGCTGCGGGGCTTCTTTTCTCATCTAT-3' (配列番号 : 30)

を合成し、kit 付属の AP1 プライマーと組み合わせて PCR を行った。

- 5      5'側 (N 末領域) の増幅のために、まず一回目の PCR 反応を m R1 と AP1 のプライマーセットを用いて行った。3'側 (C 末領域) の増幅のためには、一回目の PCR 反応を m F1 と AP1 のプライマーセットで行った。各プライマー 200pM と各 0.1mM dNTP、Klen Taq polymerase 0.25ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 25ml とした。増幅のためのサイクルは 98℃ 10 秒、72℃ 2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃ 10 秒、70℃ 2 分のサイクルを 5  
10 回、98℃ 10 秒、68℃ 2 分 30 秒のサイクルを 25 回くりかえした。次にその一回目の PCR 反応液を鋳型にして二回目の PCR を行った。5'側の増幅は一回目と同様のプライマーセット、3'側の増幅は m F3 と AP1 プライマーセットを用い、一回目の PCR と同様の反応液組成で反応液を調製した。PCR 反応は 98℃ 10 秒、72℃ 2 分のサイクルを 5 回、続いて 98℃ 10 秒、70℃ 2 分のサイクルを 5 回、98℃ 10 秒、68℃ 2 分 30 秒のサイクルを 38 回くりかえした  
15 。

5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は 1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR 産物のバンドを QIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は実施例 3 と同様の方法で行った。

さらに得られた配列をもとに 2 つのプライマー

- 20 moF : 5'-TTTAGACTTAGACGAAATGGA-3' (配列番号 : 31)

moR : 5'-GCTCCGTAGCCTCTGAAGTC-3' (配列番号 : 32)

- を合成し、先に示した、マウス脳 poly(A)<sup>+</sup>RNA より SuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素で合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、マウス型生理活性ペプチド全長 cDNA を含む断片を増幅した。反応は KlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10 秒、56℃ 20  
25 秒、72℃ 15 秒のサイクルを 35 回くりかえした。約 600bp の増副産物を 2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出し、そのバンドを QIA quick Gel

Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、クローニングベクター pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) へサブクローニング、大腸菌 JM109 へ導入し、形質転換体 E. coli JM109/ pmLP4 を得た。実施例 3 と同様の方法で塩基配列を解析し、決定した塩基配列（配列番号：34）と予測されるアミノ酸配列（配列番号：33）を図7に示す。

5

#### 実施例7

（1）ラット脳幹周辺部のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット脳幹周辺部cDNAを鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：35）およびプライマー2（配列番号：36）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix（CLONTECH社）1/50量、プライマー1（配列番号：35）およびプライマー2（配列番号：36）を各0.2μM、dNTPs 200μM、および酵素に添付のバッファーを加え、50μlの液量とした。PCR反応は、① 94℃・2分の後、② 94℃・30秒、72℃・2分のサイクルを3回、③ 94℃・30秒、68℃・2分のサイクルを3回、④ 94℃・30秒、64℃・30秒、68℃2分のサイクルを30回繰り返し、⑤ 最後に68℃・8分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列（配列番号：38）を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列（配列番号：37）を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をrOT7T022Lと命名した。

25 本発明のラット脳幹周辺部由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNA（配列番号：38）がサブクローニングされたプラスミドpAK-rO

T022Lを、自体公知の方法に従い大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10Bに導入して、  
形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pAK-rOT022Lを得た。

(2) G蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T022L発現CHO細胞の樹立

直径10 cm の組織培養用シャーレに  $1 \times 10^6$  個の CHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種し、2  
4時間培養した。(1)で得られた rOT7T022L発現ベクター pAK-rOT022  
Lを20  $\mu$ g用い、リポソーム法による遺伝子導入キット (ジエントランスファ、ニッポ  
ンジーン社)を用いて、DNA・リポソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交  
換し、これにDNA・リポソームの複合体を添加して一晩インキュベートした。培地を新鮮  
なものと交換してさらに1日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換して2日間培養  
した。さらに、トリプシン-EDTA処理によってシャーレ内の細胞を回収し、細胞密度が  
希薄な状態にて再培養を行うことによって、形質転換体の割合の増加を図った。これにより  
、rOT7T022Lを安定に高発現する細胞株 CHO-rOT7T022Lのクローンを  
得た。

(3) Met-Pro-His-Ser-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号：39) の合成

市販 p-メチルBHA樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.5  
mmole 分をペプチド合成機 (アプライド バイオシテムズ社製430A) の反応器に入れ、  
DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸 Boc-Phe を HOBt/DCC 法で活性化し p-メチルBH  
A樹脂に導入した。樹脂を 50% TFA/DCMで処理し、Boc 基を除去してアミノ基を遊  
離させ、DIEA で中和した。このアミノ基に次のアミノ酸 Boc-Arg(Tos)を HOBt/DCC 法で縮  
合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、  
Boc-Leu、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asn、Boc-Ala、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)  
、Boc-Pro、Boc-Met を順次縮合した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を 50% TFA/D  
CMで処理し樹脂上の Boc 基を除去後、樹脂を乾燥し Met-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Phe-  
Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.73g を得た。

この樹脂 0.25g を p-クレゾール 5.1g、弗化水素 15ml と共にテフロン製弗化水素反応装  
置中で 0℃・60分間反応させた。弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル

100ml を加え攪拌後、グラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを 50%酢酸水溶液 50ml 中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約 5 ml までに濃縮した後、セファデックス G-25 (2 x 90 cm) のカラムに付し 50%酢酸水で展開し主要画分を集め凍結乾燥した。次にこの粗精製ペプチドを 5 %チオグリコール酸/50%酢酸 1.5ml に溶解し、50℃ 12 時間保持し Met 酸化体ペプチドを還元した後、LiChroprep (商品名) RP-18 (MERCK 社製) を充填した逆相系カラムにつけ 0.1% TFA 水と 0.1% TFA 含有 33%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度 27 %前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末 26mg を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1428.7 (理論値 1428.8)

10 HPLC 溶出時間 18.0 分

カラム条件

カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A 液 (0.1% TFA 含有 5%アセトニトリル水)

B 液 (0.1% TFA 含有 55%アセトニトリル水) を用い

15 A 液から B 液へ直線型濃度勾配溶出 (25 分)

流速: 1.0 ml/分

(4) Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 40) の合成

上述の実施例 7 (3) と同様にして、Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Val を順次縮合し、Boc-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.43g を得た。この樹脂 0.22g を同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物 46mg を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 969.5 (理論値 969.6)

HPLC 溶出時間 11.8 分

カラム条件

25 カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A 液 (0.1% TFA 含有 5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

(5) Ser-Ala-Gly-Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Arg-Ser-NH<sub>2</sub> (配列番号: 41) の合成

- 5 上述の実施例7(3)と同様にして、Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl)を順次縮合し、Boc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-pMBHA-resin 0.62gを得た。この樹脂0.23gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物71mgを得た。

- 10 質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1156.4 (理論値 1156.6)

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

- 15 B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

(6) rOT7T022 L (配列番号: 37) とペプチドMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39) およびペプチドVPNLPQRFamide (配列番号: 40) のサイトセ

- 20 ンサーによる反応実験

上述の実施例7(2)で得られた rOT7T022 L 受容体発現CHO細胞を、 $2.7 \times 10^5$  cells/capsule の密度でサイトセンサー用カプセルに播種し、一晚培養した後にサイトセンサーのワークステーションに装着した。サイトセンサーの流路にセットしたアッセイ用の培地 (0.1%のウシ血清アルブミンを含有する low buffered RPMI1640 medium) を、ポンプ ON (80 秒間) ポンプOFF (40 秒間) のサイクルで細胞に供給し、各サイクルごとにポンプ停止8秒後から30秒間の細胞外pHの変化率を acidification rate として算出した。



acidification rate の経時変化をモニターし、安定した値を示すようになったところで流路の切り換えによって細胞に各ペプチドを7分2秒間暴露した。各ウェルの Acidification Rate の値をペプチドを暴露する直前の3サイクルの値を100%として標準化し、細胞の反応の比較を行なったところ、r0T7T022 L 発現CHO細胞はペプチドMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39) およびペプチドVPNLPQRFamide (配列番号: 40) に対して強く用量依存的な反応を示す事が明らかになった (図8)。

#### 実施例8 ヒト新規生理活性ペプチド候補スプライシングバリエーション cDNA を保持する形質転換体の作成

10 上記実施例3で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR™2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選  
15 択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase  
20 処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pRF2を得た。

#### 25 実施例9 ウシ新規生理活性ペプチド cDNA を保持する形質転換体の作成

実施例4で作製したウシ視床下部 cDNA 1 ml を鋳型として、次の二つのプライマー (bFF

、bFR) を用いて PCR による増幅を行った。

bFF: 5'-TTCTAGATTTTGGACAAAATGGAAATT-3' (配列番号: 5 2)

bFR: 5'-CGTCTTTAGGGACAGGCTCCAGATTTC-3' (配列番号: 5 3)

反応液の組成は合成プライマー (bFF および bFR) 各 20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA  
polymerase 0.5 ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 50 ml とした。増幅のため  
のサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10 秒、65℃・20  
秒、72℃・20 秒のサイクルを 40 回くりかえした。増幅産物の確認は 1.2%アガロース電気泳  
動およびエチジウムブロミド染色によって行った。実施例 3 で行った PCR 後の反応産物は  
1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさの DNA 断片の増幅を確認し  
た後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いて DNA を回収した。TA クロー  
ニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター p  
CR<sup>TM</sup>2.1 ヘサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝酒造) に  
導入して形質転換したのち、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTG お  
よび X-gal を含む LB 寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊  
枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、自動プ  
ラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製した DNA を用  
いて EcoRI による切断を行い、挿入されている cDNA 断片の大きさを確認した。さら  
に調製した DNA を RNase 処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿に  
よって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit  
(ABI 社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシエリ  
ヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pbRF2 を得た。

実施例 10 ペプチド MPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39) およびペ  
プチド VPNL PQR Famide (配列番号: 40) の r0T7T022 L (配列番号: 37)  
発現 CHO 細胞に対する cAMP 産生抑制活性

実施例 7 (3) および (4) で合成したペプチド MPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39)

、VPNLPQRFamide（配列番号：40）が rOT7T022L 受容体に対して特異的に反応することが実施例7（6）のサイトセンサーによる実験で確認できた。次に上述したペプチドの rOT7T022L 発現 CHO 細胞に対する cAMP 産生抑制活性の測定を行った。

実施例7（2）で得られた rOT7T022L 発現 CHO 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well の濃度で 24well  
5 プレートに巻き、37 度で 2 日間培養した。ハンスバッファー（HBSS）に 0.05% BSA と 0.2mM IBMX を加えたバッファーで細胞を洗浄したのち、同じバッファーで 30 分間 37 度で放置した。30 分後細胞を上記のバッファーに Forskolin  $10^{-6}$  M を加えたアッセイバッファーと同時にさまざまな濃度の上述したペプチドを添加し、37 度 30 分間インキュベーションをした。

30 分後各 well の細胞内の cAMP 濃度を cAMP EIA Kit（アマシャム社）の方法にしたがって測定した。その結果、図9に示すようにペプチド MPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）  
10 、VPNLPQRFamide（配列番号：40）は rOT7T022L 受容体発現 CHO 細胞に対して cAMP 産成抑制効果を示し、その  $IC_{50}$  値はそれぞれ 0.5nM、0.7nM と非常に低濃度で強い効果を示した。

#### 実施例11 ヒト視床下部の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA のクロー 15 ニングと塩基配列の決定

ヒト視床下部 cDNA（CLONTECH 社）を鋳型とし、2 個のプライマー、  
プライマー1：5'- GTCGACATGG AGGGGGAGCC CTCCCAGCCT C -3'（配列番号：57）およびプライマー2：5'- ACTAGTTCAG ATATCCCAGG CTGGAATGG -3'（配列番号：58）を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA を 10 分の 1 量を鋳型として使用し、  
20 Advantage-HF Polymerase Mix（CLONTECH 社）1/50 量、プライマー1（配列番号：57）およびプライマー2（配列番号：58）を各 0.2  $\mu$  M、dNTPs 200  $\mu$  M、Dimethyl Sulfoxide 4%、および酵素に添付のバッファーを加え、25  $\mu$  l の液量とした。PCR 反応は、① 94℃・2 分の後、② 94℃・20 秒、72℃・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、③ 94℃・20 秒、67℃・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、④ 94℃・20 秒、62℃・20 秒、72℃・68℃・1 分 30 秒のサイクルを 38  
25 回繰り返し、最後に 68℃・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応後の反応産物を TA クローニングキット（Invitrogen 社）の処方に従いプラスミドベクター pCR2.1（Invitrogen 社）

ヘサブクロニングした。これを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入し、cDNA を持つクローンをアンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA 配列（配列番号：55 および 56）を得た。これら 2 種類の配列は、第 597 残基で一塩基異なるが、導き出されるアミノ酸配列は同一（配列番号：57）であり、このアミノ酸配列を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を hOT7T022 と命名した。また 2 種類の形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022T（配列番号：55 で表される cDNA を含有する）、ならびに (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022G（配列番号：56 で表される cDNA を含有する）と命名した。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチド、レセプター蛋白質などは、例えば、神経細胞刺激活性などを有するため、神経疾患治療薬などとして使用することができる。また、本発明のポリペプチドまたはレセプター蛋白質は、本発明のポリペプチドまたはレセプター蛋白質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる化合物は神経疾患の予防・治療剤として期待される。さらに、本発明のポリペプチドまたはレセプター蛋白質に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはレセプター蛋白質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたはレセプター蛋白質の定量などに使用することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 5 2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. 請求項1記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 4. 配列番号：1の第81番目（Met）ないし第92番目（Phe）のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
5. 配列番号：1の第101番目（Ser）ないし第112番目（Ser）のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 15 6. 配列番号：1の第124番目（Val）ないし第131番目（Phe）のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
7. 請求項1記載のポリペプチドの部分ペプチドのアミドまたはその塩。
- 20 8. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
9. 配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表される塩基配列を有する請求項8記載のDNA。
10. 請求項3記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
- 25 11. 配列番号：2で表される塩基配列の第241番目ないし第276番目の塩基を含有してなる請求項10記載のDNA。

- 1 2. 配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第336番目の塩基を含有してなる請求項10記載のDNA。
- 1 3. 配列番号：2で表される塩基配列の第370番目ないし第393番目の塩基を含有してなる請求項10記載のDNA。
- 5 1 4. 請求項8または請求項10記載のDNAを含有する組換えベクター。
- 1 5. 請求項14記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 1 6. 請求項15記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項3記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 10 1 7. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
- 1 8. 請求項8もしくは請求項10記載のDNAまたは請求項17記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 15 1 9. 請求項8または請求項10記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA。
- 2 0. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤。
- 20 2 1. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
- 2 2. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはその
- 25

のエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

23. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項22記載のスクリーニング方法。

24. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット

25. 請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するする蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項24記載のスクリーニング用キット

26. 請求項22記載のスクリーニング方法または請求項24記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

27. 請求項22記載のスクリーニング方法または請求項24記載のスクリーニング用キ

ットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

28. 配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。

29. 配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：54で表されるアミノ酸配列である請求項28記載の蛋白質またはその塩。

30. 請求項28記載の蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

31. 請求項28記載の蛋白質または請求項30記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

32. 配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表される塩基配列を有する請求項31記載のDNA。

33. 請求項31記載のDNAを含有する組換えベクター。

34. 請求項33記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

35. 請求項34記載の形質転換体を培養し、請求項28記載の蛋白質または請求項30記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項28記載の蛋白質またはその塩、または請求項30記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

36. 請求項28記載の蛋白質またはその塩、または請求項30記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

37. 請求項31記載のDNAまたは請求項36記載の抗体を含有してなる診断薬。

38. 請求項28記載の蛋白質またはその塩、または請求項30記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることにより得られる請求項28

記載の蛋白質またはその塩に対するリガンド。

39. 請求項28記載の蛋白質またはその塩、または請求項30記載の部分ペプチドもし



くはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 28 記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

40. 請求項 28 記載の蛋白質またはその塩、または請求項 30 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項 28 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

41. 請求項 28 記載の蛋白質またはその塩、または請求項 30 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項 28 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

42. 請求項 40 記載のスクリーニング方法または請求項 41 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項 28 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

43. 請求項 40 記載のスクリーニング方法または請求項 41 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項 28 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

44. 請求項 36 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 28 記載の蛋白質またはその塩の定量方法。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



1

```

5'   9      18      27      36      45      54
    ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
    ---
    Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
    ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

      117      126      135      144      153      162
    AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
    ---
    Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

      171      180      189      198      207      216
    AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
    ---
    Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

      225      234      243      252      261      270
    ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
    ---
    Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

      279      288      297      306      315      324
    AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
    ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

      333      342      351      360      369      378
    CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
    ---
    Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

      387      396      405      414      423      432
    CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
    ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

      441      450      459      468      477      486
    AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
    ---
    Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

      495      504      513      522      531      540
    TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
    ---
    Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

```

TAA 3'

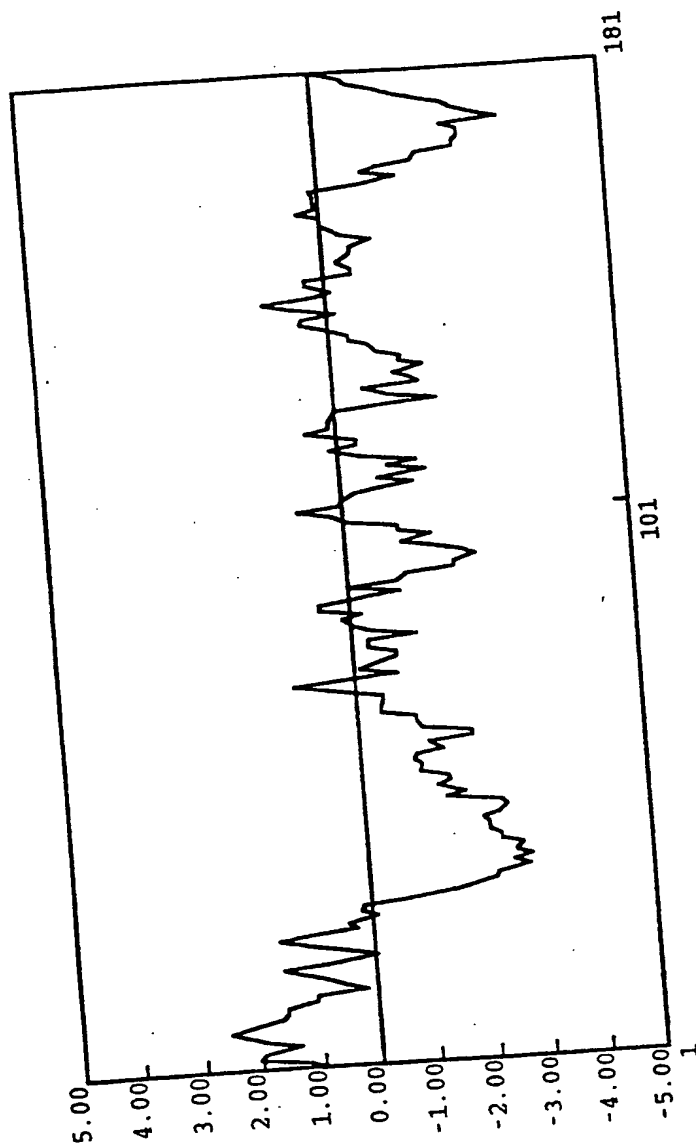
---

\*\*\*

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図

2



**THIS PAGE IS BLANK (USPTO)**



3

```

5'   9      18      27      36      45      54
   ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
   TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

      117      126      135      144      153      162
   AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

      171      180      189      198      207      216
   AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

      225      234      243      252      261      270
   ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

      279      288      297      306      315      324
   AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

      333      342      351      360      369      378
   CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

      387      396      405      414      423      432
   CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

      441      450      459      468      477      486
   AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

      495      504      513      522      531      540
   TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

      549      558      567      576      585
   AGA CTG CTA TTC AAG AAA ATA GAT GAT GCA GAA TTG AAA CAA GAA AAA TAA 3'
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys Gln Glu Lys ***

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





4

```

5'  ATG GAA ATT ATT TCA TTA AAA CGA TTC ATT TTA TTG ATG TTA GCC ACT TCA AGC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr Ser Ser

      9      18      27      36      45      54
      63      72      81      90      99      108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATC TTC TGC ACA GAC GAA TCA AGG ATG CCC AAT CTT TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met Pro Asn Leu Tyr

      117      126      135      144      153      162
    AGC AAA AAG AAT TAT GAC AAA TAT TCC GAG CCT AGA GGA GAT CTA GGC TGG GAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gly Trp Glu

      171      180      189      198      207      216
    AAA GAA AGA AGT CTT ACT TTT GAA GAA GTA AAA GAT TGG GCT CCA AAA ATT AAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys

      225      234      243      252      261      270
    ATG AAT AAA CCT GTA GTC AAC AAA ATG CCA CCT TCT GCA GCC AAC CTG CCA CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu

      279      288      297      306      315      324
    AGA TTT GGG AGG AAC ATG GAA GAA GAA AGG AGC ACT AGG GCG ATG GCC CAC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Met Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu

      333      342      351      360      369      378
    CCT CTG AGA CTC GGA AAA AAT AGA GAG GAC AGC CTC TCC AGA TGG GTC CCA AAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Pro Leu Arg Leu Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn

      387      396      405      414      423      432
    CTG CCC CAG AGG TTT GGA AGA ACA ACA ACC AAA AGC ATT ACC AAG ACC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu

      441      450      459      468      477      486
    AGT AAT TTG CTC CAG CAG TCC ATG CAT TCA CCA TCT ACC AAT GGG CTA CTC TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu Leu Tyr

      495      504      513      522      531      540
    TCC ATG GCC TGC CAG CCC CAA GAA ATC CAG AAT CCT GGT CAA AAG AAC CTA AGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln Lys Asn Leu Arg

      549      558      567      576      585
    AGA CGG GGA TTC CAG AAA ATA GAT GAT GCA GAA TTG AAA CAA GAA AAA TAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys Gln Glu Lys ***
  
```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5

```

5'   9      18      27      36      45      54
    ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAG CGA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCA ACT TCA AGC
    ---
    Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTC TTA ACT TCA AAC ACC CTT TGT TCA GAT GAA TTA ATG ATG CCC CAT TTT CAC
    ---
    Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met Pro His Phe His

      117      126      135      144      153      162
    AGC AAA GAA GGT TAT GGA AAA TAT TAC CAG CTG AGA GGA ATC CCA AAA GGG GTA
    ---
    Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Gly Ile Pro Lys Gly Val

      171      180      189      198      207      216
    AAG GAA AGA AGT GTC ACT TTT CAA GAA CTC AAA GAT TGG GGG GCA AAG AAA GAT
    ---
    Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp

      225      234      243      252      261      270
    ATT AAG ATG AGT CCA GCC CCT GCC AAC AAA GTG CCC CAC TCA GCA GCC AAC CTT
    ---
    Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu

      279      288      297      306      315      324
    CCC CTG AGG TTT GGG AGG AAC ATA GAA GAC AGA AGA AGC CCC AGG GCA CGG GCC
    ---
    Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala

      333      342      351      360      369      378
    AAC ATG GAG GCA GGG ACC ATG AGC CAT TTT CCC AGC CTG CCC CAA AGG TTT GGG
    ---
    Asn Met Glu Ala Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly

      387      396      405      414      423      432
    AGA ACA ACA GCC AGA CGC ATC ACC AAG ACA CTG GCT GGT TTG CCC CAG AAA TCC
    ---
    Arg Thr Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser

      441      450      459      468      477      486
    CTG CAC TCC CTG GCC TCC AGT GAA TCG CTC TAT GCC ATG ACC CGC CAG CAT CAA
    ---
    Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln His Gln

      495      504      513      522      531      540
    GAA ATT CAG AGT CCT GGT CAA GAG CAA CCT AGG AAA CGG GTG TTC ACG GAA ACA
    ---
    Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val Phe Thr Glu Thr

      549      558      567      576      585      594
    GAT GAT GCA GAA AGG AAA CAA GAA AAA ATA GGA AAC CTC CAG CCA GTC CTT CAA
    ---
    Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn Leu Gln Pro Val Leu Gln

      603      612
    GGG GCT ATG AAG CTG TGA 3'
    ---
    Gly Ala Met Lys Leu ***

```

THIS PAGE IS BLANK (ISPTO)

hLPLRF.aa	1	MEIISKLEFI	10	20	30	40	50	50
bLPLRF.aa	1	MEIISKLEFI	10	20	30	40	50	50
rLPLRF.aa	1	MEIISKLEFI	10	20	30	40	50	50
hLPLRF.aa	51	---YPKG---	60	70	80	90	100	100
bLPLRF.aa	51	LGWEX---	60	70	80	90	100	100
rLPLRF.aa	51	---PKGVKER	60	70	80	90	100	100
hLPLRF.aa	101	VQERSAGAT	110	120	130	140	150	150
bLPLRF.aa	101	MEERSSTRAM	110	120	130	140	150	150
rLPLRF.aa	101	EDRSFRAR	110	120	130	140	150	150
hLPLRF.aa	151	DQGSMSHS	160	170	180	190	200	200
bLPLRF.aa	151	NLQGSMSHS	160	170	180	190	200	200
rLPLRF.aa	151	GLPKSTHSL	160	170	180	190	200	200
hLPLRF.aa	201	K*	210	220	230	240	250	250
bLPLRF.aa	201	K*	210	220	230	240	250	250
rLPLRF.aa	201	KIGNLQFVLQ	210	220	230	240	250	250

ⓧ

6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



7

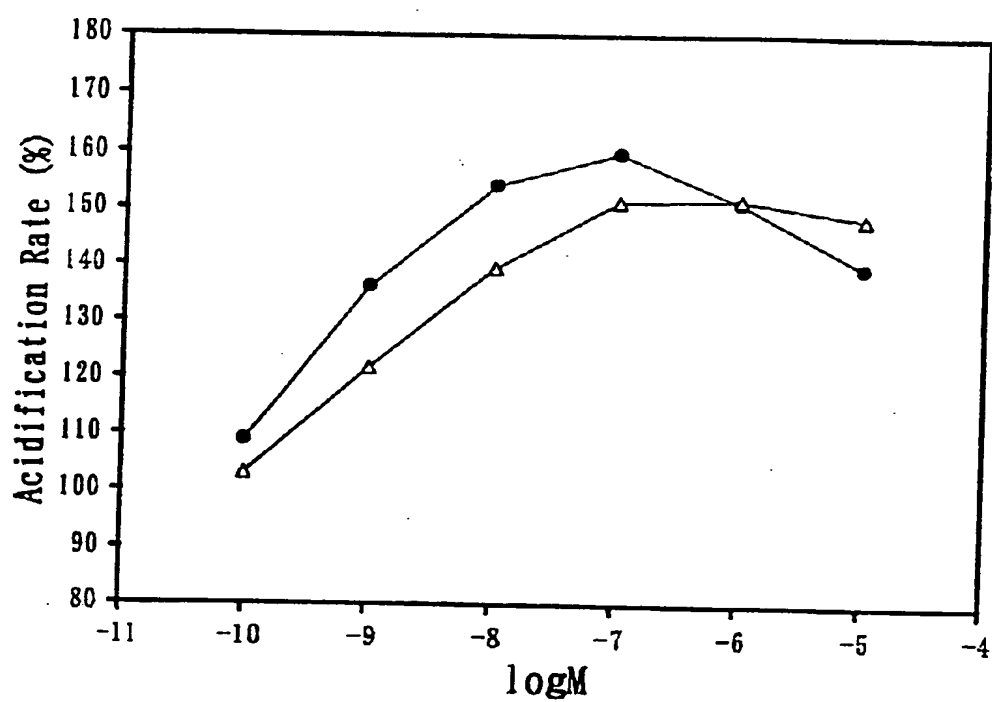
1	TTTAGACTTAGACGAAATGGAAATTATTTTCATTAAAACGATTCATTTTATTGACTGTG	58
1	MetGluIleIleSerLeuLysArgPheIleLeuLeuThrVal	14
59	GCAACTTCAAGCTTCTTAACATCAAAACACCTTCTGTACAGATGAGTTCATGATGCCTCAT	118
15	AlaThrSerSerPheLeuThrSerAsnThrPheCysThrAspGluPheMetMetProHis	34
119	TTTCACAGCAAAGAAGGTGACGGAATACTCCCAGCTGAGAGGAATCCCAAAGGGGAA	178
35	PheHisSerLysGluGlyAspGlyLysTyrSerGlnLeuArgGlyIleProLysGlyGlu	54
179	AAGGAAAGAAGTGTCAGTTTTCAAGAACTAAAAGATTGGGGGGCAAAGAATGTTATTAAG	238
55	LysGluArgSerValSerPheGlnGluLeuLysAspTrpGlyAlaLysAsnValIleLys	74
239	ATGAGTCCAGCCCCTGCCAACAAAGTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTGCCCTGAGATTT	298
75	MetSerProAlaProAlaAsnLysValProHisSerAlaAlaAsnLeuProLeuArgPhe	94
299	GGAAGGACCATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGCAGCACGGGTCAACATGGAGGCAGGGACC	358
95	GlyArgThrIleAspGluLysArgSerProAlaAlaArgValAsnMetGluAlaGlyThr	114
359	AGGAGCCATTTCCCCAGCCTGCCCCAAAGGTTTGGGAGAACAACAGCCAGAAGCCCCAAG	418
115	ArgSerHisPheProSerLeuProGlnArgPheGlyArgThrThrAlaArgSerProLys	134
419	ACACCCGCTGATTTGCCACAGAAACCCCTGCACTCACTGGGCTCCAGCGAGTTGCTCTAC	478
135	ThrProAlaAspLeuProGlnLysProLeuHisSerLeuGlySerSerGluLeuLeuTyr	154
479	GTCATGATCTGCCAGCACCAAGAAATTCAGAGTCCTGGTGAAAGCGAACGAGGAGAGGA	538
155	ValMetIleCysGlnHisGlnGluIleGlnSerProGlyGlyLysArgThrArgArgGly	174
539	GCGTTTGTGGAAACAGATGATGCAGAAAGGAAACCAGAAAAATAGGAAACCTCGAGCCCC	598
175	AlaPheValGluThrAspAspAlaGluArgLysProGluLys***	188
599	ACTTCAAGAGGCTACGGAGC	618
188		188

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





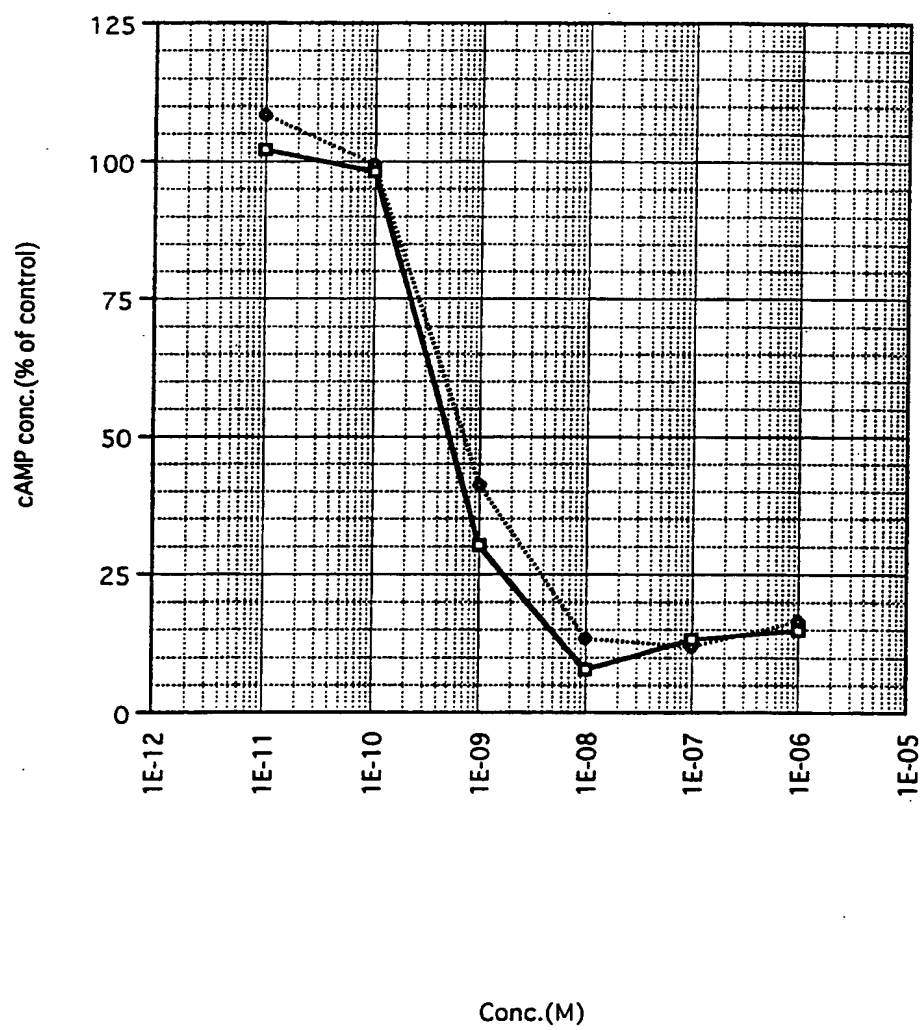
8



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> 2568W00P

<150> JP 10-323759

<151> 1998-11-13

<150> JP 11-060030

<151> 1999-03-08

<150> JP 11-106812

<151> 1999-04-14

<150> JP 11-166672

<151> 1999-06-14

<150> JP 11-221640

<151> 1999-08-04

<150> JP 11-259818

<151> 1999-09-14

<160> 58

<210> 1

<211> 180

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met  
20 25 30  
Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg  
35 40 45  
Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp  
50 55 60  
Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys  
65 70 75 80  
Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val  
85 90 95  
Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser  
100 105 110  
Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro  
115 120 125  
Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu  
130 135 140  
Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu  
145 150 155 160  
Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln  
165 170 175  
Lys Gln Ser Arg  
180

**THIS PAGE RANK (USPTO)**



<210> 2

<211> 540

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```
ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA   60
ACATCAAACA TTTTGTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT  120
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG  180
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA  240
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTGTTGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA  300
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGA AGAAATATGGA GGTGAGCCTC  360
GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC  420
TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA  480
TTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG  540
```

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 3

GGGCTGCACA TAGAGACTTA ATTTTAG

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<223>

<400> 4

CTAGACCACC TCTATATAAC TGCCCAT

27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GCACATAGAG ACTTAATTTT AGATTTAGAC

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

CATGCACTTT GACTGGTTTC CAGGTAT

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CAGCTTTAGG GACAGGCTCC AGGTTTC

27

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met  
20 25 30  
Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg  
35 40 45  
Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp  
50 55 60  
Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys  
65 70 75 80  
Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val  
85 90 95  
Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser  
100 105 110  
Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro  
115 120 125  
Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu  
130 135 140  
Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu  
145 150 155 160  
Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln  
165 170 175

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Lys Gln Ser Arg Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu

180

185

190

Lys Gln Glu Lys

195

<210> 9

<211> 588

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60

ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120

TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180

GAATTAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240

ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300

AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGAA GAAATATGGA GGTGAGCCTC 360

GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC 420

TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA 480

TTTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG 540

AGACTGCTAT TCAAGAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA 588

<210> 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GCCTAGAGGA GATCTAGGCT GGGAGGA

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

GGGAGGAACA TGGAAGAAGA AAGGAGC

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

GATGGTGAAT GCATGGACTG CTGGAGC

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

TTCCTCCCAA ATCTCAGTGG CAGGTTG

27

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 14

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr

1

5

10

15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met

20

25

30

Pro Asn Leu Tyr Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35

40

45

Gly Asp Leu Gly Trp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val

50

55

60

Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys

65

70

75

80

Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Met

85

90

95

Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu

100

105

110

Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro

115

120

125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu

130

135

140

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu  
145                      150                      155                      160  
Leu Tyr Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln  
                         165                      170                      175  
Lys Asn Leu Arg Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu  
                         180                      185                      190  
Lys Gln Glu Lys  
                         195

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

ATGGAAATTA TTTCATTAAA ACGATTCATT TTATTGATGT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60

ACATCAAACA TCTTCTGCAC AGACGAATCA AGGATGCCCA ATCTTTACAG CAAAAAGAAT 120

TATGACAAAT ATTCCGAGCC TAGAGGAGAT CTAGGCTGGG AGAAAGAAAG AAGTCTTACT 180

TTTGAAGAAG TAAAAGATTG GGCTCCAAAA ATTAAGATGA ATAAACCTGT AGTCAACAAA 240

ATGCCACCTT CTGCAGCCAA CCTGCCACTG AGATTTGGGA GGAACATGGA AGAAGAAAGG 300

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

AGCACTAGGG CGATGGCCCA CCTGCCTCTG AGACTCGGAA AAAATAGAGA GGACAGCCTC 360

TCCAGATGGG TCCCAAATCT GCCCCAGAGG TTTGGAAGAA CAACAACAGC CAAAAGCATT 420

ACCAAGACCC TGAGTAATTT GCTCCAGCAG TCCATGCATT CACCATCTAC CAATGGGCTA 480

CTCTACTCCA TGGCCTGCCA GCCCCAAGAA ATCCAGAATC CTGGTCAAAA GAACCTAAGG 540

AGACGGGGAT TCCAGAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA 588

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 16

CCCTGGGGCT TCTTCTGTCT TCTATGT

27

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 17

AGCGATTCAT TTTATTGACT TTAGCA

26

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 18

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met  
20 25 30  
Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg  
35 40 45  
Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu  
50 55 60  
Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
65 70 75 80  
Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
85 90 95  
Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala  
100 105 110  
Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
115 120 125  
Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
130 135 140  
Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
145 150 155 160  
His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
165 170 175  
Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn  
180 185 190

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu

195

200

<210> 19

<211> 609

<212> DNA

<213> Rat

<400> 19

ATGGAAATTA TTTCATCAAA GCGATTCATT TTATTGACTT TAGCAACTTC AAGCTTCTTA 60  
ACTTCAAACA CCCTTTGTTC AGATGAATTA ATGATGCCCC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120  
TATGGAAAAT ATTACCAGCT GAGAGGAATC CAAAAGGGG TAAAGGAAAG AAGTGTCACT 180  
TTTCAAGAAC TCAAAGATTG GGGGGCAAAG AAAGATATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240  
AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTT CCCCTGAGGT TTGGGAGGAA CATAGAAGAC 300  
AGAAGAAGCC CCAGGGCAGC GGCCAACATG GAGGCAGGGA CCATGAGCCA TTTTCCCAGC 360  
CTGCCCCAAA GGTTTGGGAG AACAACAGCC AGACGCATCA CCAAGACACT GGCTGGTTTG 420  
CCCCAGAAAT CCCTGCACTC CCTGGCCTCC AGTGAATCGC TCTATGCCAT GACCCGCCAG 480  
CATCAAGAAA TTCAGAGTCC TGGTCAAGAG CAACCTAGGA AACGGGTGTT CACGGAAACA 540  
GATGATGCAG AAAGGAAACA AGAAAAAATA GGAAACCTCC AGCCAGTCCT TCAAGGGGCT 600  
ATGAAGCTG 609

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

MGNTTYGGNA AR

12

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 21

MGNTTYGGNM GN

12

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 22

MGNWSNGGNA AR

12

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 23

MGNWSNGGNM GN

12

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

MGNYTNGGNA AR

12

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 25

MGNYTNGGNM GN

12

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 26

GACTTAATTT TAGATTTAGA CAAAATGGAA

30

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<223>

<400> 27

TTCTCCCAAA CCTTTGGGGC AGGTT

25

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 28

ACAGCAAAGA AGGTGACGGA AAATACTC

28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 29

ATAGATGAGA AAAGAAGCCC CGCAGCAC

28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<223>

<400> 30

GTGCTGCGGG GCTTCTTTTC TCATCTAT

28

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 31

TTTAGACTTA GACGAAATGG A

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

GCTCCGTAGC CTCTGAAGT C

21

<210> 33

<211> 188

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 33

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Val Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Phe Cys Thr Asp Glu Phe Met Met  
20 25 30  
Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Asp Gly Lys Tyr Ser Gln Leu Arg  
35 40 45  
Gly Ile Pro Lys Gly Glu Lys Glu Arg Ser Val Ser Phe Gln Glu Leu  
50 55 60  
Lys Asp Trp Gly Ala Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
65 70 75 80  
Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
85 90 95  
Thr Ile Asp Glu Lys Arg Ser Pro Ala Ala Arg Val Asn Met Glu Ala  
100 105 110  
Gly Thr Arg Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
115 120 125  
Thr Ala Arg Ser Pro Lys Thr Pro Ala Asp Leu Pro Gln Lys Pro Leu  
130 135 140  
His Ser Leu Gly Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Val Met Ile Cys Gln His  
145 150 155 160  
Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gly Lys Arg Thr Arg Arg Gly Ala Phe  
165 170 175  
Val Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Pro Glu Lys  
180 185

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 564

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 34

ATGGAAATTA TTTCATTAAC ACGATTCATT TTATTGACTG TGGCAACTTC AAGCTTCTTA 60  
ACATCAAACA CCTTCTGTAC AGATGAGTTC ATGATGCCTC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120  
GACGGAAAAT ACTCCCAGCT GAGAGGAATC CAAAAGGGG AAAAGGAAAG AAGTGTCAGT 180  
TTTCAAGAAC TAAAAGATTG GGGGGCAAAG AATGTTATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240  
AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTG CCCCTGAGAT TTGGAAGGAC CATAGATGAG 300  
AAAAGAAGCC CCGCAGCACG GGTCAACATG GAGGCAGGGA CCAGGAGCCA TTTCCCCAGC 360  
CTGCCCCAAA GGTTCGGGAG AACAACAGCC AGAAGCCCCA AGACACCCGC TGATTTGCCA 420  
CAGAAACCCC TGCACTCACT GGGCTCCAGC GAGTTGCTCT ACGTCATGAT CTGCCAGCAC 480  
CAAGAAATTC AGAGTCCTGG TGGAAAGCGA ACGAGGAGAG GAGCGTTTGT GGAAACAGAT 540  
GATGCAGAAA GGAAACCAGA AAAA 564

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

AGTCGACAGT ATGGAGGCGG AGCCCTC

27

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 36

GACTAGTTCA AATGTTCCAG GCCGGGATG

29

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 37

Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro Leu Gly

				5						10					15				
Gln	Asn	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Phe				
			20					25					30						
Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Met	Phe	Ile	Ala				
		35				40						45							
Ala	Tyr	Val	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Val				
	50					55					60								
Cys	Phe	Ile	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	His	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Asn	Met				
65					70				75					80					
Phe	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Phe	Cys				
			85					90					95						
Met	Pro	Thr	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Ile	Thr	Gly	Trp	Pro	Phe	Asp				
		100						105					110						
Asn	Ala	Thr	Cys	Lys	Met	Ser	Gly	Leu	Val	Gln	Gly	Met	Ser	Val	Ser				
		115					120					125							
Ala	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	Phe	Arg	Cys				
	130					135					140								
Ile	Val	His	Pro	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Phe				
145					150				155				160						
Thr	Ile	Ala	Val	Ile	Trp	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Ser				
			165				170					175							
Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Arg	Glu	Glu	His	His	Phe	Met	Leu	Asp				
		180					185					190							
Ala	Arg	Asn	Arg	Ser	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Ser	Cys	Trp	Glu	Ala	Trp	Pro				

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

195	200	205
Glu Lys Gly Met Arg Lys Val Tyr Thr Ala Val Leu Phe Ala His Ile		
210	215	220
Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Val Arg Ile Ala		
225	230	235
Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Arg Asp Thr Glu Glu Ala		
245	250	255
Val Ala Glu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His		
260	265	270
Met Leu Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu		
275	280	285
Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Leu Gln		
290	295	300
Leu His Leu Leu Ser Val Tyr Ala Phe Pro Leu Ala His Trp Leu Ala		
305	310	315
Phe Phe His Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu		
325	330	335
Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Gln Leu Cys Trp		
340	345	350
Pro Pro Trp Ala Ala His Lys Gln Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Asn Arg		
355	360	365
Leu Leu Arg Arg Arg Val Val Val Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly		
370	375	380
Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Val Pro Gly Pro Gly Arg		
385	390	395
Leu Pro Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His Gln Asp Gly Pro Gly Glu		
405	410	415
Gly Pro Gly Cys Asn His Met Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asn Ile		
420	425	430

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 38

ATGGAGGCGG AGCCCTCCCA GCCTCCCAAC GGCAGCTGGC CCCTGGGTCA GAACGGGAGT	60
GATGTGGAGA CCAGCATGGC AACCAGCCTC ACCTTCTCCT CCTACTACCA AACTCCTCT	120
CCGGTGGCAG CCATGTTTAT CGCGGCCTAC GTGCTCATCT TCCTCCTCTG CATGGTGGGC	180

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

AACACCCTGG TCTGCTTCAT TGTGCTCAAG AACCGGCACA TGCGCACTGT CACCAACATG 240  
TTTATCCTCA ACCTGGCCGT CAGCGACCTG CTGGTGGGCA TCTTCTGCAT GCCCACAACC 300  
CTTGTGGACA ACCTTATCAC TGGTTGGCCT TTTGACAACG CCACATGCAA GATGAGCGGC 360  
TTGGTGCAGG GCATGTCCGT GTCTGCATCG GTTTTCACAC TGGTGGCCAT CGCTGTGGAA 420  
AGGTTCCGCT GCATCGTGCA CCCTTCCGC GAGAAGCTGA CCCTTCGGAA GGCCTGTTC 480  
ACCATCGCGG TGATCTGGGC TCTGGCGCTG CTCATCATGT GTCCCTCGGC GGTCACTCTG 540  
ACAGTACCC GAGAGGAGCA TCACTTCATG CTGGATGCTC GTAACCGCTC CTACCCGCTC 600  
TACTCGTGCT GGGAGGCCTG GCCGAGAAG GGCATGCGCA AGGTCTACAC CGCGGTGCTC 660  
TTCGCGCACA TCTACCTGGT GCCGCTGGCG CTCATCGTAG TGATGTACGT GCGCATCGCG 720  
CGCAAGCTAT GCCAGGCCCC CGGTCCTGCG CGCGACACGG AGGAGGCGGT GGCCGAGGGT 780  
GGCCGCACTT CGCGCCGTAG GGCCCGCGTG GTGCACATGC TGGTCATGGT GGCGCTCTTC 840  
TTCACGTTGT CCTGGCTGCC ACTCTGGGTG CTGCTGCTGC TCATCGACTA TGGGGAGCTG 900  
AGCGAGCTGC AACTGCACCT GCTGTGGTC TACGCCTTCC CCTTGGCACA CTGGCTGGCC 960  
TTCTTCCACA GCAGCGCCAA CCCCATCATC TACGGCTACT TCAACGAGAA CTTCCGCCGC 1020  
GGCTTCCAGG CTGCCTTCCG TGCACAGCTC TGCTGGCCTC CCTGGGCCGC CCACAAGCAA 1080  
GCCTACTCGG AGCGGCCCAA CCGCCTCCTG CGCAGGCGGG TGGTGGTGGA CGTGCAACCC 1140  
AGCGACTCCG GCCTGCCATC AGAGTCTGGC CCCAGCAGCG GGGTCCCAGG GCCTGGCCGG 1200  
CTGCCACTGC GCAATGGGCG TGTGGCCAT CAGGATGGCC CGGGGAAGG GCCAGGCTGC 1260  
AACCACATGC CCCTCACCAT CCCGGCCTGG AACATTTGA 1299

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 39

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
1 5 10

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

<400> 40

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1 5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

<400> 41

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Arg Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 36

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTT	36
<210> 43	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Human	
<400> 43	
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCT	36
<210> 44	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Human	
<400> 44	
GTTCTAACC TGCCCCAAAG GTTT	24
<210> 45	
<211> 276	
<212> DNA	
<213> Human	
<400> 45	
ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA	60
ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT	120
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG	180
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA	240
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTT	276
<210> 46	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> Human	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;400&gt; 46

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120  
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240  
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300  
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCT 336

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 47

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120  
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240  
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300  
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGA AGAAATATGGA GGTGAGCCTC 360  
GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTT 393

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CCCTGGGGCT TCTTCTGTCT TCTATGT

27

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 49

AGCGATTCAT TTTATTGACT TTAGCA

26

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 50

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

85	90	95	
Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala			
100	105	110	
Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr			
115	120	125	
Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser			
130	135	140	
Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln			
145	150	155	160
His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val			
165	170	175	
Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn			
180	185	190	
Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu			

195

200

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 51

ATGGAAATTA TTTCATCAAA GCGATTCATT TTATTGACTT TAGCAACTTC AAGCTTCTTA	60
ACTTCAAACA CCCTTTGTTC AGATGAATTA ATGATGCCCC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT	120
TATGGAAAAT ATTACCAGCT GAGAGGAATC CCAAAAGGGG TAAAGGAAAG AAGTGTCACT	180
TTTCAAGAAC TCAAAGATTG GGGGGCAAAG AAAGATATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC	240
AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTT CCCCTGAGGT TTGGGAGGAA CATAGAAGAC	300

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



AGAAGAAGCC CCAGGGCACG GGCCAACATG GAGGCAGGGA CCATGAGCCA TTTTCCCAGC 360  
CTGCCCCAAA GGTTTGGGAG AACAAACAGCC AGACGCATCA CCAAGACACT GGCTGGTTTG 420  
CCCCAGAAAT CCCTGCACTC CCTGGCCTCC AGTGAATTGC TCTATGCCAT GACCCGCCAG 480  
CATCAAGAAA TTCAGAGTCC TGGTCAAGAG CAACCTAGGA AACGGGTGTT CACGGAAACA 540  
GATGATGCAG AAAGGAAACA AGAAAAAATA GGAAACCTCC AGCCAGTCCT TCAAGGGGCT 600  
ATGAAGCTG 609

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 52

TTCTAGATTT TGGACAAAAT GGAAATT

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 53

CGTCTTTAGG GACAGGCTCC AGATTTC

27

<210> 54

<211> 430

<212> PRT

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 54

Met Glu Gly Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Ser Ser Trp Pro Leu Ser  
1 5 10 15  
Gln Asn Gly Thr Asn Thr Glu Ala Thr Pro Ala Thr Asn Leu Thr Phe  
20 25 30  
Ser Ser Tyr Tyr Gln His Thr Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ala Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val  
50 55 60  
Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met His Thr Val Thr Asn Met  
65 70 75 80  
Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys  
85 90 95  
Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp  
100 105 110  
Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser  
115 120 125  
Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys  
130 135 140  
Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Val  
145 150 155 160  
Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser  
165 170 175  
Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Val Asp  
180 185 190  
Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

195	200	205
Glu Lys Gly Met Arg Arg Val Tyr Thr Thr Val Leu Phe Ser His Ile		
210	215	220
Tyr Leu Ala Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Ala Arg Ile Ala		
225	230	235
Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Pro Gly Gly Glu Glu Ala		240
245	250	255
Ala Asp Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His Met Leu		
260	265	270
Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu Trp Ala		
275	280	285
Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Gln Leu Ser Ala Pro Gln Leu His		
290	295	300
Leu Val Thr Val Tyr Ala Phe Pro Phe Ala His Trp Leu Ala Phe Phe		
305	310	315
Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu Asn Phe		320
325	330	335
Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Arg Leu Cys Pro Arg Pro		
340	345	350
Ser Gly Ser His Lys Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Gly Gly Leu Leu		
355	360	365
His Arg Arg Val Phe Val Val Val Arg Pro Ser Asp Ser Gly Leu Pro		
370	375	380
Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Arg Pro Gly Arg Leu Pro		
385	390	395
Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His His Gly Leu Pro Arg Glu Gly Pro		400
405	410	415

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Cys Ser His Leu Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asp Ile

420

425

430

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 55

ATGGAGGGG AGCCCTCCCA GCCTCCCAAC AGCAGTTGGC CCCTAAGTCA GAATGGGACT 60  
AACACTGAGG CCACCCCGGC TACAAACCTC ACCTTCTCCT CCTACTATCA GCACACCTCC 120  
CCTGTGGCGG CCATGTTTCAT TGTGGCCTAT GCGCTCATCT TCCTGCTCTG CATGGTGGGC 180  
AACACCCTGG TCTGTTTCAT CGTGCTCAAG AACCGGCACA TGCATACTGT CACCAACATG 240  
TTCATCCTCA ACCTGGCTGT CAGTGACCTG CTGGTGGGCA TCTTCTGCAT GCCCACCACC 300  
CTTGTGGACA ACCTCATCAC TGGGTGGCCC TTCGACAATG CCACATGCAA GATGAGCGGC 360  
TTGGTGCAGG GCATGTCTGT GTCGGCTTCC GTTTTCACAC TGGTGGCCAT TGCTGTGGAA 420  
AGGTTCCGCT GCATCGTGCA CCCTTTCCGC GAGAAGCTGA CCCTGCGGAA GCGCTCGTC 480  
ACCATCGCCG TCATCTGGGC CCTGGCGCTG CTCATCATGT GTCCCTCGGC CGTCACGCTG 540  
ACCGTCACCC GTGAGGAGCA CCACTTCATG GTGGACGCCC GCAACCGCTC CTACCCTCTC 600  
TACTCCTGCT GGGAGGCCTG GCCCGAGAAG GGCATGCGCA GGGTCTACAC CACTGTGCTC 660  
TTCTCGCACA TCTACCTGGC GCCGCTGGCG CTCATCGTGG TCATGTACGC CCGCATCGCG 720  
CGCAAGCTCT GCCAGGCCCC GGGCCCGGCC CCCGGGGGCG AGGAGGCTGC GGACCCGCGA 780  
GCATCGCGGC GCAGAGCGCG CGTGGTGCAC ATGCTGGTCA TGGTGGCGCT GTTCTTCACG 840  
CTGTCCTGGC TGCCGCTCTG GCGCTGCTG CTGCTCATCG ACTACGGGCA GCTCAGCGCG 900  
CCGCAGCTGC ACCTGGTCAC CGTCTACGCC TTCCCCTTCG CGCACTGGCT GGCCTTCTTC 960  
AACAGCAGCG CCAACCCCAT CATCTACGGC TACTTCAACG AGAACTTCCG CCGCGGCTTC 1020  
CAGGCCGCT TCCGCGCCCG CCTCTGCCCC CGCCCGTCGG GGAGCCACAA GGAGGCCTAC 1080  
TCCGAGCGGC CCGGCGGGCT TCTGCACAGG CGGGTCTTCG TGGTGGTGC GCCCAGCGAC 1140  
TCCGGGCTGC CCTCTGAGTC GGGCCCTAGC AGTGGGGCCC CCAGGCCCGG CCGCCTCCCG 1200

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



CTGCGGAATG GGCGGGTGGC TCACCACGGC TTGCCCAGGG AAGGGCCTGG CTGCTCCAC 1260  
CTGCCCCCTCA CCATTCCAGC CTGGGATATC 1290

<210> 56

<211> 1290

<212> DNA

<213> Human

<400> 56

ATGGAGGGGG AGCCCTCCCA GCCTCCCAAC AGCAGTTGGC CCCTAAGTCA GAATGGGACT 60  
AACACTGAGG CCACCCCGGC TACAAACCTC ACCTTCTCCT CCTACTATCA GCACACCTCC 120  
CCTGTGGCGG CCATGTTTAT TGTGGCCTAT GCGCTCATCT TCCTGCTCTG CATGGTGGGC 180  
AACACCCTGG TCTGTTTCAT CGTGCTCAAG AACCGGCACA TGCATACTGT CACCAACATG 240  
TTCATCCTCA ACCTGGCTGT CAGTGACCTG CTGGTGGGCA TCTTCTGCAT GCCCACCACC 300  
CTTGTGGACA ACCTCATCAC TGGGTGGCCC TTCGACAATG CCACATGCAA GATGAGCGGC 360  
TTGGTGCAGG GCATGTCTGT GTCGGCTTCC GTTTTCACAC TGGTGGCCAT TGCTGTGGAA 420  
AGGTTCCGCT GCATCGTGCA CCCTTTCCGC GAGAAGCTGA CCCTGCGGAA GGCCTCGTC 480  
ACCATCGCCG TCATCTGGGC CCTGGCGCTG CTCATCATGT GTCCCTCGGC CGTCACGCTG 540  
ACCGTCACCC GTGAGGAGCA CCACTTCATG GTGGACGCCC GCAACCGCTC CTACCCGCTC 600  
TACTCCTGCT GGGAGGCCTG GCCCGAGAAG GGCATGCGCA GGGTCTACAC CACTGTGCTC 660  
TTCTCGCACA TCTACCTGGC GCCGCTGGCG CTCATCGTGG TCATGTACGC CCGCATCGCG 720  
CGCAAGCTCT GCCAGGCCCC GGGCCCGGCC CCCGGGGGCG AGGAGGCTGC GGACCCGCGA 780  
GCATCGCGGC GCAGAGCGCG CGTGGTGAC ATGCTGGTCA TGGTGGCGCT GTTCTTCACG 840  
CTGTCCTGGC TGCCGCTCTG GCGCTGCTG CTGCTCATCG ACTACGGGCA GCTCAGCGCG 900  
CCGCAGCTGC ACCTGGTCAC CGTCTACGCC TTCCCTTCG CGCACTGGCT GGCCTTCTTC 960  
AACAGCAGCG CCAACCCCAT CATCTACGGC TACTTCAACG AGAACTTCCG CCGCGGCTTC 1020  
CAGGCCGCT TCCGCGCCCG CCTCTGCCCC CGCCCGTCGG GGAGCCACAA GGAGGCCTAC 1080  
TCCGAGCGGC CCGGCGGGCT TCTGCACAGG CGGGTCTTCG TGGTGGTGCG GCCCAGCGAC 1140  
TCCGGGCTGC CCTCTGAGTC GGGCCCTAGC AGTGGGGCCC CCAGGCCCGG CCGCCTCCCG 1200

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CTGCGGAATG GCGGGGTGGC TCACCACGGC TTGCCAGGG AAGGGCCTGG CTGCTCCCAC 1260

CTGCCCCTCA CCATTCCAGC CTGGGATATC 1290

<210> 57

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 57

GTCGACATGG AGGGGGAGCC CTCCCAGCCT C 31

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

ACTAGTTCAG ATATCCCAGG CTGGAATGG 29

**THIS PAGE RANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06283

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97) (Family: none)	1-44
X	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD), 10 July, 1997 (10.07.97) & AU, 9712084, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A2	1-44
X	Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol.53, No.3, p.315-324	1-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 February, 2000 (17.02.00)

Date of mailing of the international search report  
29 February, 2000 (29.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28,  
A61K 39/395, G01N 33/50, C07K 2/00, A61K 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16. 9月. 1997 (16. 09. 97) ファミリーなし	1-44
X	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEM IND LTD) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & AU, 9712084, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A2	1-44
X	Daniela Marazziti et al., "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis", Genomics (1998), Vol. 53, No. 3, p. 315-324	1-44

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 02. 00

国際調査報告の発送日

29. 02. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

印

4 B

9 3 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(1)

\_\_\_\_\_